

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE POS GRADO

**Identificación y caracterización molecular de
secuencias homólogas al T-DNA del plásmido Ti de
Agrobacterium spp. insertados en el genoma de
Ipomoea batatas (L.) Lam "camote" y especies
silvestres relacionadas**

TESIS

para optar el grado académico de Magíster en Biología Molecular

AUTOR:

Dora Graciela Quispe Huamanquispe

ASESOR:

Débora E. Alvarado Iparraguirre, Jan Kreuze

Lima-Perú

2012

ASESORES:

Asesor interno: Mg. Débora Alvarado Iparraguirre

Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM)

Asesor externo: PhD Jan Kreuze

Centro Internacional de la Papa (CIP)

Dedicatoria:

A mis padres, Dora y Marcelino, por ser mi motivación de cada día.

AGRADECIMIENTOS

- Al Centro Internacional de la Papa (CIP), por el financiamiento brindado para la realización de la presente tesis y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) por co-financiar los estudios de maestría.
- A Jan Kreuze, por la confianza depositada en mí para el desarrollo de este trabajo, ser mi asesor y apoyarme con sus conocimientos y consejos.
- A los investigadores del CIP, David Tay, Genoveva Rossel y Ronald Robles por su apoyo constante y sobre todo brindarme las facilidades para trabajar con el material biológico del Banco de Germoplasma del CIP.
- A Godelieve Gheysen y Tina Kyndt de la Universidad de Gante (Bélgica), quienes me abrieron las puertas de su laboratorio para realizar algunas pruebas experimentales y estuvieron pendientes de mi trabajo hasta su culminación.
- A mi asesora en la universidad Débora Alvarado, por el tiempo compartido y su apoyo en este trabajo.
- A Milton Untiveros, mi « *adviser* » mis primeros días en el CIP, de quien he aprendido mucho a nivel profesional y también personal, gracias por motivarme y acompañarme a seguir toda esta aventura que fue la maestría.
- A los miembros del *Jan's group* Elizabeth Fernández, Bruno Lértora, Wilbert Cruz, Gabriela Lajo, Yuriko Ortega, Clauvis Tanning y Ada Sumi por la ayuda compartida y el tiempo divertido que pasamos juntos en el laboratorio.
- A mis amigos de la maestría Rosalina Tincopa y Luis Saravia, con quienes compartimos gratos momentos dentro y fuera de las horas de clases.

- A mis amigos de toda la vida: Magaly Gavancho, Esther Salcedo y Melvin Fernández por acompañarme tanto en los momentos gratos así como en los difíciles, sé que puedo contar con ustedes de manera incondicional.
- A mi familia: Mis padres Marcelino y Dora, mi hermano Angel y mi sobrina Angie, por su amor, confianza y apoyo durante las diferentes etapas de mi vida.

I. INTRODUCCIÓN

La transferencia horizontal de genes (HGT) ha sido uno de los temas más debatidos en biología evolutiva durante las últimas dos décadas debido a que esto ha desafiado considerablemente nuestra visión acerca de la historia evolutiva de los genomas. En el caso de organismos procariotas como las bacterias, la adquisición de genes de otros individuos alejados filogenéticamente les ha permitido producir genomas extraordinariamente heterogéneos y dinámicos cambiando por tanto, la ecología y la patogenicidad de las especies bacterianas (Maiden 1998; Gogarten *et al.*, 2002; Ochman *et al.*, 2000).

En eucariotas también se ha registrado la ocurrencia de eventos de HGT, los cuales incluyen a un gran número de genes provenientes de varios donadores en los rotíferos de la clase *Bdelloidea* (Gladyshev *et al.*, 2008) o la transferencia de genes de la bacteria intracelular *Wolbachia* dentro del genoma de sus hospederos artrópodos (Hotopp *et al.*, 2007). En plantas, el modelo mejor conocido sigue siendo el del género *Agrobacterium* cuyo mecanismo de infección involucra la transferencia e integración de una región del plásmido Ti al genoma de la célula vegetal. El impacto de este hallazgo ha tenido grandes aplicaciones en diversos campos de la biología vegetal, agricultura y biotecnología.

Sin embargo, el descubrimiento de secuencias homólogas al T-DNA del plásmido Ri de *Agrobacterium rizhognenes* en el genoma de especies del género *Nicotiana* (White *et al.*, 1983; Furner *et al.*, 1986), *Daucus carota* “zanahoria” (Spano *et al.*, 1982) y *Convolvulus arvensis* (Tepfer, 1982) han evidenciado que la ocurrencia de este tipo de eventos actúan como una fuerza significativa en la evolución de genomas eucariotas (Richardson y Palmer, 2007; Bock, 2010; Talianova y Janousek, 2011).

La importancia de estos hallazgos incrementa la necesidad de realizar más investigaciones para entender el mecanismo de flujo horizontal de genes a través de bacterias en la evolución de plantas superiores, por lo que el presente trabajo de tesis pretende identificar y caracterizar la presencia de secuencias homólogas al T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium* spp. en el genoma de *Ipomoea batatas* (L.) Lam “camote” y especies silvestres relacionadas, con el fin de

evidenciar la ocurrencia de eventos de HGT en este género y el posible impacto de este hallazgo en su evolución.

1.2 Hipótesis general

Teniendo en cuenta el hallazgo de secuencias homólogas al T-DNA de *Agrobacterium* spp. en el genoma de diferentes especies de plantas, consideramos que estas secuencias, se encuentran también en el genoma de *Ipomoea batatas* (L.) Lam “camote” y en especies silvestres relacionadas.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General:

- Identificar y caracterizar a nivel molecular la presencia de secuencias homólogas al T-DNA de *Agrobacterium* spp. en el genoma de *Ipomoea batatas* (L.) Lam “camote” y especies silvestres relacionadas.

1.3.2 Objetivos Específicos:

- Determinar la presencia de secuencias homólogas a genes del T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium* spp. en *Ipomoea batatas* (L.) Lam (6x) cv. Huachano “camote”.
- Determinar la presencia de secuencias homólogas a genes del T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium* spp. en otros 86 cultivares de *Ipomoea batatas* (L.) Lam (6x) “camote” pertenecientes a diferentes países donde crece este cultivo, en 5 entradas de *Ipomoea batatas* (L.) Lam (4x), *Ipomoea trifida* (2x) e *Ipomoea tabascana* (4x).
- Determinar el número de copias de los genes transferidos del T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium* spp. a los genomas receptores.

II. ANTECEDENTES

2.1 El camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam)

2.1.1 Descripción y clasificación

El camote es una dicotiledónea rastrera perenne que pertenece a la familia de las Convolvuláceas (*Convolvulaceae*), posee hojas en forma de corazón o lobuladas palmeadas y flores simpétalas (Figura 1A). *I. batatas* (L.) Lam es una de las plantas cultivadas de mayor importancia de los más de 50 géneros y 1000 especies miembros de esta familia. Su sabor dulce, raíz tuberosa grande y alto contenido de almidón hacen de este cultivo una importante raíz reservante (Woolfe, 1992). Las hojas jóvenes y los brotes algunas veces son consumidos como verduras mientras que las raíces tuberosas largas y afiladas (Figura 1B) con cáscara lisa, de colores que varían entre el rojo, morado, marrón y blanco se comen crudos, cocidos o fritos. Los nombres más comunes para esta planta en el Perú y otros países de la región son batata, boniato, chaco, papa dulce, apichu (quechua) o kumara.

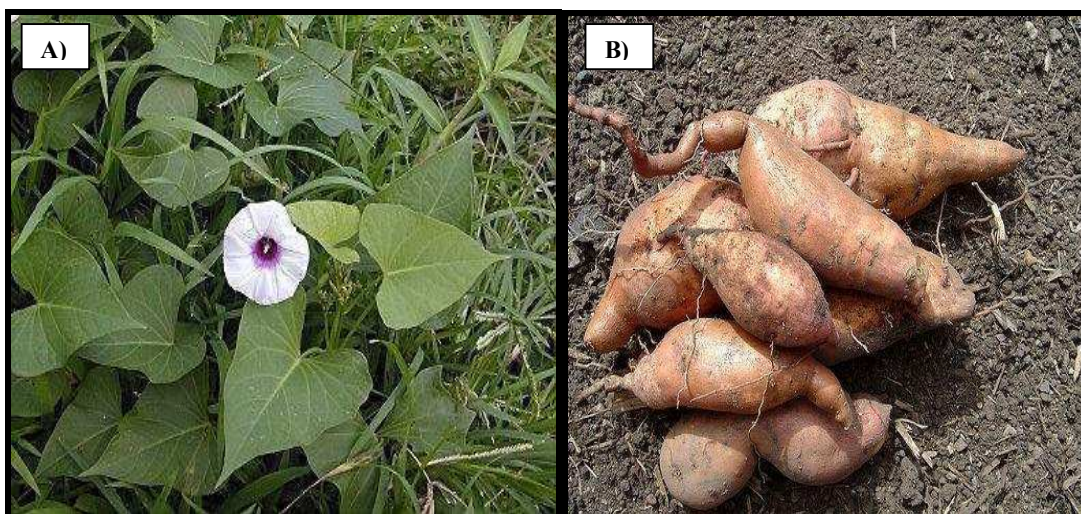


Figura 1.- *Ipomoea batatas* (L.)Lam “camote” A) Planta de camote en el campo, B) Raíces tuberosas de color naranja.

<http://www.everydayguide.com/how-to-grow-sweet-potatoes>

Clasificación taxonómica del camote (<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=IPBA2&display=3>):

División: Magnoliophyta

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Convolvulaceae

Género: *Ipomoea* L.

Serie: Batatas

Especie: *Ipomoea batatas* (L.) Lam

Esta especie fue descrita por Linneo en 1753 como *Convolvulus batatas*. Sin embargo, en 1791, Lamarck clasificó esta especie dentro del género *Ipomoea* basándose en la forma del estigma y a la superficie de los granos de polen. Por lo tanto, el nombre fue cambiado a *Ipomoea batatas* (L.) Lam (Huamán 1992).

El número de cromosomas en la planta de camote es $2n = 6x = 90$. Esto indica que es una especie hexaploide con un número básico de cromosomas $x = 15$. Sin embargo, también se ha registrado para esta especie entradas tetraploides $2n = 4x = 60$, a las cuales se les ha denominado camotes (4x) (Bohac *et al.*, 1993).

En el camote, tanto el origen de su poliploidía como la identidad de su ancestro silvestre todavía se encuentran en debate. Sin embargo, se han propuesto hipótesis como la de Zhang *et al* (2001) que sugieren que el camote tiene una constitución genética alo-auto-hexaploide (tetradisómica) con dos

genomas diferentes (B1B1B2B2B2B2), ello basado en el estudio de microsatélites “SSRs”, (*Short Sequence Repeat*).

2.1.2 Origen y distribución

Los restos arqueológicos de camotes más antiguos en el mundo han sido los encontrados en las cuevas del cañón de Chilca (Perú) con una antigüedad de 8,000 años (Woolfe, 1992). El análisis de sus gránulos de almidón indica que aunque fueron significativamente más pequeños en tamaño en comparación a los actuales cultivares, ellos son definitivamente de la especie *I. batatas* (L.) Lam (Perry, 2002).

Los primeros estudios basados en el análisis de caracteres morfológicos y el número de especies silvestres del género *Ipomoea*, postularon que el centro de origen del camote fue algún lugar de la región comprendida entre la península de Yucatán en México y la desembocadura del río Orinoco en Venezuela (Austin, 1977; 1987). Asimismo, el camote cuenta con centros secundarios de diversidad genética (áreas geográficas donde el cultivo evolucionó separadamente de sus ancestros) como la región comprendida entre Perú y Ecuador (Zhang *et al.*, 1998); y Papua Nueva Guinea, Indonesia y Filipinas (Carey *et al.*, 1992).

El desarrollo posterior de marcadores moleculares como los RFLPs (*Restricted Fragment Length Polymorphisms*) en los años 80, los RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) y los SSR en los años 90, han dado nuevas luces para resolver el complejo tema del origen y la domesticación del camote. En este sentido, trabajos basados en marcadores moleculares (RFLP, RAPD, y SSR) confirmaron la relación filogenética cercana entre *I. batatas* (L.) Lam y la especie silvestre *I. trifida* (Jarret *et al.*, 1992; Jarret y Austin, 1994; Buteler *et al.*, 1999), previamente reportada con el análisis de datos morfológicos (Austin, 1977, 1987). Otras evidencias basadas en el análisis de restricción de DNA cloroplástico fueron más lejos e indicaron que *I. trifida* es probablemente uno de los antecesores de *I. batatas* (L.) Lam (Huang y Sun, 2000). Adicionalmente, estudios basados en la secuencia génica de la β -amilasa, un gen nuclear bastante conservado, sugirieron que *I. batatas* (L.) Lam, *I. trifida* e *I. tabascana* forman un grupo monofilético, es decir descienden del mismo ancestro (Rajapakse *et al.*, 2004).

Trabajos recientes mediante citogenética molecular usando FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), llevados a cabo en este cultivo han afianzado los resultados previos acerca de la relación filogenética cercana entre *I. trifida* e *I. batatas* (L.) Lam. Además, también se ha observado que la organización cromosómica de esta última está más relacionada a *I. trifida* que a *I. tabascana*. Las investigaciones basadas en esta técnica concluyen que más de un progenitor está involucrado en la filogenia del camote hexaploide. Una hipótesis alopoliploide es mantenida con una composición formada por al menos dos genomas diferentes, una de una especie cercanamente relacionada y otra de una pariente distante (Srisuwan *et al.*, 2006).

2.1.3 Historia del cultivo

El camote fue ampliamente cultivado a lo largo de América Central y del Sur antes del primer contacto europeo. Este cultivo fue una de las primeras plantas introducidas a Europa después de los viajes de Colón en 1492. De Europa los exploradores portugueses en el siglo XVI expandieron este cultivo al África, India, Sureste de Asia y las Indias Orientales, alcanzando luego Nueva Guinea, las islas del Pacífico Oeste, China y Japón (Rajendran, 1990).

El origen del cultivo en el Pacífico ha sido un enigma de larga data. Restos carbonizados de camotes de las islas de Pascua y de Hawaii son anteriores al primer contacto europeo. Por lo que se sugiere que el camote pudo haber sido distribuido a Nueva Zelanda 1150-1250 años después de Cristo. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la distribución del camote a lo largo de las islas del Pacífico se llevó a cabo por los viajeros peruanos o polinesios.

Barrau (1957 citado por Yen, 1974) y Yen (1982) han propuesto la famosa hipótesis “tripartita” que intenta explicar cómo ocurrió la introducción del camote en las islas del Pacífico. Ésta se basa en tres posibles vías: 1) La *línea kumara*, que consiste en una introducción prehistórica de clones de áreas costeras de América del Sur llevada a cabo por viajeros peruanos o polinesios. 2) La *línea batatas*, mediante el cual los exploradores portugueses transfirieron cultivares de las Indias Occidentales a África, India y las Indias Orientales, y 3) La *línea kamote*, donde los galeones españoles propagaron clones de camote de México a las Filipinas a través del comercio en el Pacífico.

Rossel *et al.*, (2000), basados en el análisis de marcadores AFLPs, evidenciaron la escasa relación entre el germoplasma de Perú-Ecuador y el de Oceanía, sugiriendo que esta región pueda no ser el origen del material del Pacífico. Por lo que la *línea camote* sea la más probable fuente de introducción.

2.1.4 Importancia del cultivo

La importancia de este cultivo radica en su valor nutritivo. Las raíces reservantes poseen un alto contenido de carbohidratos y β -caroteno (un precursor de la vitamina A), y sus hojas se caracterizan por ser ricas en proteínas. Las raíces también contienen vitamina C, complejo B y E así como potasio, calcio y hierro. Adicionalmente, los camotes de pulpa morada contienen antioxidantes tales como las antocianinas (Bradshaw, 2010)

Además de su valor nutricional, el camote es el séptimo cultivo más importante en el mundo, con una producción anual de alrededor de 110 Mt (millones de toneladas) y una superficie cultivada de 9 millones de hectáreas (FAOSTAT, 2009). En la mayoría de los países en desarrollo, se trata de un cultivo de pequeños agricultores tolerante a un amplio rango de condiciones edáficas y climáticas. Una de las principales características de este cultivo es que se adapta desde el nivel del mar hasta los 2,500 metros de altura, razón por la cual se ha convertido en el alimento básico de las comunidades que viven en las tierras altas de Uganda, Ruanda y Burundi en el este de África y en Papua Nueva Guinea. Los países asiáticos, particularmente China, son los principales productores, abarcando el 80% de la producción mundial (FAO, 2006). En América Latina, destacan en producción Brasil, Argentina, Perú, Cuba y Haití (FAO, 2009).

En el Perú, la mayor zona de producción de camote es el departamento de Lima en donde se concentra el 70% de la superficie cultivada; siendo las provincias de Huaral (800 Ha) y Cañete (3,500 Ha) las principales zonas productoras de camote, las cuales ofertan al mercado capitalino 120 mil toneladas métricas (TM) anuales. Los valles del norte chico Huacho, Barranca y Pativilca, poseen menor superficie de siembra (700 Ha) y aportan alrededor 12 mil TM para los mercados de Lima. Los valles costeros de Ancash, cultivan aproximadamente

1,500 hectáreas. En cambio, los valles costeros de los departamentos de Lambayeque y la Libertad registran una superficie de siembra de 2,300 Ha. En los valles de Ica y Arequipa cultivan 1000 Ha. (INIA, 2006) (Figura 2).



Figura 2.- Zonas productoras de camote en el Perú (INIA, 2006).

Los agricultores usan sólo esquejes de campos de producción en vez de semilla y así los costos del material propagador son también mínimos (Karyeija *et al.*, 1998). A pesar de estas condiciones, este cultivo produce cantidades notables de biomasa, a menudo produciendo más energía comestible que cualquier otro cultivo principal (CIP, 1996). Por estas razones, el camote, es considerado como un cultivo ideal para una agricultura de subsistencia que pueda reducir los problemas de hambruna y malnutrición en muchos lugares del mundo.

2.2 *Agrobacterium* spp.

Agrobacterium es un género de bacterias Gram-negativa que usan la transferencia horizontal de genes para causar diversas enfermedades neoplásicas en plantas, las cuales incluyen: “Agalla de la corona” (*Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium vitis*), “raíces fibrosas” (*Agrobacterium rhizogenes*) y “agalla de caña” (*Agrobacterium rubi*) (Escobar y Dandekar, 2003).

El mecanismo de infección de *Agrobacterium* es un fenómeno natural en el cual la bacteria transforma genéticamente células de la planta infectada. El

proceso de transformación depende de la presencia de un plásmido en la bacteria, de 200-800 Kb (Zaenen *et al.*, 1974; Costantino *et al.*, 1994; Broothaerts *et al.*, 2005), llamado pTi (plásmido inductor de tumores) en el caso de *A. tumefaciens* y *A. vitis*, o pRi (plásmido inductor de raíces) en el caso de *A. rhizogenes*. Estos plásmidos llevan un fragmento de DNA denominado DNA de transferencia “T-DNA”, el cual es transferido a la célula vegetal; y los genes de virulencia (*Vir*), los cuales codifican factores que actúan *in trans* necesarios para el procesamiento del T-DNA (Sheng y Citovsky, 1996; Zhou y Christie, 1999).

Este proceso de transferencia de genes ha sido ampliamente estudiado no sólo desde el punto de vista fitopatológico, sino también por su aplicación en el campo de la biotecnología, como método para introducir genes de interés en plantas (Tzfira y Citovsky, 2003; Llop 2003; Gelvin 2009); siendo las especies mejor caracterizadas de este género: *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes* (Figura 3).

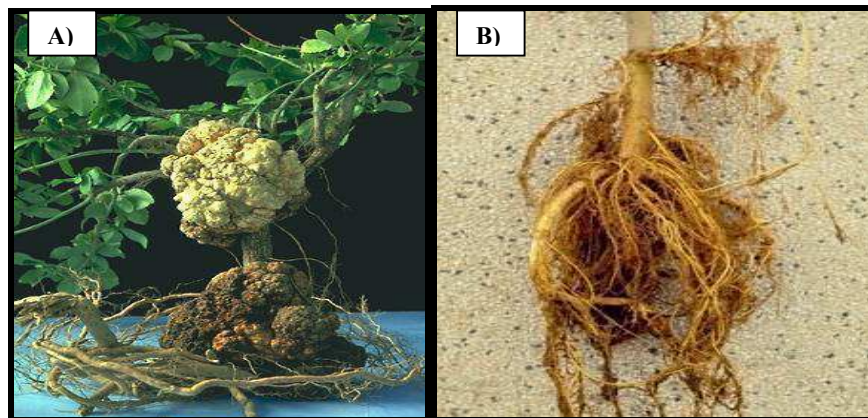


Figura 3.-Plantas infectadas con especies del género *Agrobacterium*. A) *Agrobacterium tumefaciens* y B) *Agrobacterium rizhogenes*.

www.forestryimages.org/images/768x512/5357075.jpg

2.2.1 Plásmidos Ti/Ri de *Agrobacterium*

La mayoría de los genes involucrados en la formación de tumores de *Agrobacterium* están codificados en plásmidos (Van Larebeke *et al.*, 1974; Hooykaas *et al.*, 1977; Costantino *et al.*, 1980; Holsters *et al.*, 1980).

En el género *Agrobacterium* el plásmido más característico es el Ti y la mayoría de los genes que contiene juegan papeles directos o indirectos en la tumorigénesis. Este plásmido tiene un tamaño de entre 150 a 250 Kb (Zaenen *et al.*, 1974; Wood *et al.*, 2001), aunque se han encontrado plásmidos Ti de hasta 500 Kb (Unger *et al.*, 1985). La composición media en G+C del plásmido es del 55%, aunque algunas regiones son más ricas en A-T, como el T-DNA. Se han contabilizado hasta 198 ORFs (*Open reading frame*) y probablemente todas codifican proteínas funcionales (Wood *et al.*, 2001).

Hay una gran diversidad de plásmidos Ti y se clasifican según el tipo de opina que sintetizan. Los más estudiados son los plásmidos de nopalina/agrocinopina (como los pTiC58, pTiT37) y los plásmidos de octopina/manopina (pTiB6, PtiAch5, pTiR10 y pTi15955) (Currier y Nester, 1976; Depicker *et al.*, 1977). Los plásmidos de tipo octopina tienen en común unas 65 Kb respecto al pTiC58 (Engler *et al.*, 1981).

La organización genética del plásmido Ti puede verse como una disposición en mosaico donde las regiones están más o menos bien conservadas (Tzfira y Citovsky, 2008). Globalmente, presenta una estructura modular con genes de funciones similares agrupados juntos. Así, podemos definir cinco componentes: La región del T-DNA, que codifica las secuencias que son transferidas a la planta huésped; la región *vir*, que dirige el procesamiento y transferencia del T-DNA; los loci *tra* y *trb*, que dirigen la transferencia conjugativa del plásmido Ti y que, a diferencia de los otros componentes, no están agrupados sino separados por 60 Kb; la región *rep* que se requiere para la replicación del plásmido Ti; y los genes que dirigen la adquisición y el catabolismo de las opinas (Zhu *et al.*, 2000).

2.2.2 Región T-DNA

Es el segmento de DNA que se transfiere desde la bacteria a la célula vegetal (Chilton *et al.*, 1977). A diferencia de los elementos transponibles que pueden moverse repetidamente, el T-DNA una vez transferido permanece estable, y no codifica por sí mismo los productos que median su transferencia (Joos *et al.*, 1983; Leemans *et al.*, 1982; Zambryski *et al.*, 1983). El tamaño del T-DNA varía

según el tipo de plásmidos, pero sólo los extremos, llamados bordes, se reconocen durante el proceso de transferencia (Wang *et al.*, 1984; Peralta y Ream, 1985). Estos bordes están formados por 25 pb que flanquean la región del T-DNA como repeticiones directas (Zambryski *et al.*, 1982). Estas secuencias borde dirigen la transferencia de forma polar, en dirección derecha-izquierda, determinada por la orientación de los extremos repetidos, siendo el borde derecho imprescindible para la formación del tumor (Joos *et al.*, 1983; Shaw *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 1984).

En algunas cepas de *Agrobacterium* un segundo T-DNA puede estar presente (White *et al.*, 1985). En este caso los dos T-DNAs (T_L-DNA ó T-DNA izquierdo y T_R-DNA ó derecho) son llamados T-DNA “*split*” (Veena y Taylor, 2007). El tamaño de ambos T_L-DNA y T_R-DNA es de aproximadamente 15-20 Kb y son transferidos e integrados independientemente en el genoma de la planta hospedadora (White *et al.*, 1985).

2.2.3 Mecanismo de infección de *Agrobacterium*

Los descubrimientos más importantes del mecanismo de infección se basan en las siguientes características: la tumorigénesis requiere la transferencia de fragmentos de DNA oncogénico a células de la planta infectadas; este proceso evolucionó a partir de un sistema de transferencia conjugativa; los genes que dirigen este proceso se expresan en respuesta a señales químicas que libera el huésped.

Se han descrito al menos siete pasos en la inducción tumoral: 1) Reconocimiento de una célula vegetal susceptible, 2) Unión de la bacteria a la célula vegetal, 3) Inducción de la expresión de los genes *vir*, 4) Producción de una copia transferible del T-DNA, 5) Transferencia del complejo-T a la célula vegetal, 6) Integración del complejo-T en el genoma nuclear de la planta, y 7) Expresión de los genes que contiene el T-DNA (Llop, 2003) (Figura 4).

Mientras que durante los pasos iniciales de la transferencia se utilizan procesos bacterianos bien conservados, en los pasos finales se requieren otras rutas relacionadas con el desarrollo y crecimiento de la planta.

2.2.3.1 Reconocimiento de una célula vegetal susceptible

Desde los inicios del estudio de este proceso se comprobó que la bacteria necesita heridas en la planta para causar la infección. Este hecho se podría explicar de forma simple asumiendo que las células de plantas dañadas presentan una barrera física menor a la penetración e infección que las células no dañadas, al poseer éstas las paredes celulares intactas. Sin embargo, se sabe que las células dañadas secretan compuestos fenólicos de bajo peso molecular que son reconocidos de forma específica como moléculas señal. *Agrobacterium* migra a través de un gradiente de concentración de estos compuestos hacia la herida. Estos compuestos fenólicos son principalmente acetosiringona (AS) e hidroxacetosiringona (OH-AS) (Llop, 2003). Estas moléculas son similares a productos del metabolismo del fenilpropanoide, una de las rutas metabólicas que proporciona la mayoría de los metabolitos secundarios de las plantas, que conduce a la producción de ligninas y flavonoides. La lignina es el mayor componente de la pared celular y proporciona una barrera física contra la invasión por patógenos, mientras que los flavonoides incluyen una variedad de compuestos que producen aroma, color y sabor, así como moléculas antimicrobianas específicas como las fitoalexinas. *Agrobacterium*, por tanto, usa estos compuestos como señales de la presencia de una planta potencialmente susceptible.

2.2.3.2 Unión de la bacteria a la célula vegetal

Una vez que *Agrobacterium* llega a la herida se produce una débil unión inicial, de forma polar y que es reversible (Matthysse, 1983). Posteriormente, las bacterias elaboran fibrillas de celulosa que las anclan firmemente a la superficie del huésped (Matthysse *et al.*, 1981). Los genes cromosómicos de virulencia *chvA*, *chvB* y *pscA* son los que están implicados en esta unión.

La unión bacteriana a la célula vegetal es saturable y, probablemente, está mediada por una molécula sensible a la proteasa que se encuentra en la superficie de la célula vegetal. Dos proteínas de la pared celular se han propuesto como responsables de la unión: una proteína similar a la vitronectrina (Wagner y Matthysse, 1992) y una proteína de unión ricoadhesina (Swart *et al.*, 1994).

2.2.3.3.1 Inducción de la expresión de los genes *Vir*

Los genes *Vir* están organizados en 6 *locis* mono o policistrónicos (*VirA*: 1ORF, *VirB*: 11ORFs, *VirR*: 2ORFs, *VirD*: 5ORFs, *VirE*: 2ORFs, *VirG*: 1ORF). Se ha demostrado que algunas cepas de *Agrobacterium* contienen genes *Vir* adicionales tales como *VirF*, *VirH* y *tzs*. Estos genes no son esenciales para el procesamiento del T-DNA pero si incrementan la virulencia y el rango de hospederos de la bacteria (Winans, 1992).

Cuando los compuestos fenólicos de bajo peso molecular están a una concentración de 10⁻⁵ M y el pH se encuentra entre 5.0 y 5.8 se activan los genes *vir*. La acidez es necesaria para protonar los compuestos fenólicos y así incrementar su permeabilidad de membrana. Esta inducción es un proceso lento que tarda en llegar a los máximos niveles de expresión de 8 a 16 horas.

Todos los inductores actúan sobre el operón *VirA* cuyo producto se autofosforila y, directa o indirectamente, este grupo fosfato de alta energía es transferido a la proteína *VirG* que pasa a su forma activa y estimula la transcripción del resto de genes del regulón *Vir* (Jin *et al.*, 1990).

2.2.3.4 Producción de una copia transferible del T-DNA

Una vez que los genes *vir* empiezan a transcribirse se produce el proceso de síntesis de la *cadena-T*. Las proteínas codificadas por el operón *virD* reconocen las secuencias terminales que delimitan el T-DNA (Yanofsky *et al.*, 1986). La proteína *VirD1* pasa el DNA superenrollado a la forma relajada (Ghai y Das, 1989) y, a continuación, *VirD2* corta la cadena de DNA inferior por los extremos y se une covalentemente, a través de un residuo de tirosina 29, al extremo 5' de cada cadena rota. Mientras la cadena superior permanece en forma de dúplex, aproximadamente la mitad de las inferiores están en forma lineal de cadena simple y se denominan *cadena-T* (Stachel *et al.*, 1986). Se piensa que la *cadena-T* se forma por desplazamiento durante la síntesis del DNA mediante el mecanismo de círculo giratorio “*rolling-circle*” que se inicia a partir del extremo 3' de cada borde derecho. La proteína *VirD2*, que está fuertemente unida a la *cadena-T*, le confiere polaridad asegurando que el extremo 5' sea el que entre primero en el núcleo de la célula vegetal. Este complejo ácido nucleico/proteína

está compuesto por una única molécula *VirD2* -que actúa de piloto gracias a sus secuencias de localización nuclear (NLS, *nuclear signal localization*)- unida a un DNA de cadena simple que se denomina *complejo-T* (Zupan *et al.*, 2000).

2.2.2.5 Transferencia del *complejo-T* a la célula vegetal

En este proceso un segmento del DNA específico, el *complejo-T*, es reconocido y movilizado. Esta copia debe ser transportada hasta la membrana bacteriana, atravesar en primer lugar la membrana y pared bacteriana y, posteriormente, la pared celular y la membrana de la célula vegetal. Una vez en la célula vegetal debe moverse a través del citoplasma y cruzar la membrana nuclear hasta llegar al núcleo de la célula vegetal. *VirD2* guía a la *cadena-T* a través del *pilus* compuesto por las proteínas VirB y la proteína *VirD4*.

La proteína *VirE2* también parece jugar un papel importante como guía del *complejo-T* ya que posee, como *VirD2*, secuencias NLS que median en su transporte del citoplasma al núcleo de la célula vegetal (Zupan *et al.*, 2000). Esta proteína se une firme y cooperativamente a ácidos nucleicos de cadena simple formando filamentos cilíndricos enrollados. Se creyó en un principio que *VirE2* se unía al *complejo-T* dentro de la bacteria pero se han encontrado evidencias genéticas que demuestran que se transfieren de forma separada a la célula vegetal, formando un complejo en su citoplasma (Gelvin, 2000). Por tanto, ambas proteínas *VirD2* y *VirE2* dirigen la *cadena-T* hacia el núcleo de la célula vegetal, pero también pueden hacerlo en levaduras o en células animales (Guralnick *et al.*, 1996; Relic *et al.*, 1998).

En el transporte hacia el núcleo también están implicadas diferentes proteínas de las plantas como la α -carioferina (Ballas y Citovsky, 1997) o la ciclofilina (Deng *et al.*, 1998) que interaccionan con las secuencias NLS de las proteínas *Vir*. Las ciclofilinas parece que mantienen a la proteína *VirD2* en una conformación adecuada para la transferencia, mientras el *complejo-T* se mueve por el citoplasma.

En muchos aspectos la transferencia del *complejo-T* recuerda a la transferencia conjugativa del DNA plasmídico y se ha comprobado que existen grandes similitudes de secuencia entre las proteínas *Vir* y las *Tra* (Kado, 1994;

Lessl *et al.*, 1994), lo que sugiere que el aparato de transferencia del DNA evolucionó a partir del sistema de transferencia conjugativa.

2.2.2.6 Integración del *complejo-T* en el genoma nuclear de la planta.

Esta etapa del proceso es poco conocida. En principio, el T-DNA se integra en el cromosoma vegetal por recombinación ilegítima, que es la forma mayoritaria de integración de DNA foráneo en plantas (Gheyssen *et al.*, 1991). Es probable que la mayor parte del T-DNA transferido al núcleo no se integre establemente, ya que el nivel de expresión transitoria es muy superior comparado con la estable (Nam *et al.*, 1997).

El T-DNA entra en el núcleo como una molécula de cadena simple (Gelvin *et al.*, 2000). Se desconoce si se integra en una zona del DNA vegetal localmente desnaturalizado como cadena simple y después se sintetiza la segunda cadena o si pasa a ser de doble cadena antes de la integración.

El punto de integración parece que es al azar y que no hay requisitos de secuencia específicos en el genoma vegetal para que se produzca (Mayerhofer *et al.*, 1991), aunque se ha descrito que la integración se produce preferentemente en zonas con la secuencia de DNA en estado de transcripción activa (Herman *et al.*, 1990).

Además de los componentes bacterianos, hay varias proteínas que han sido encontradas esenciales para la integración del T-DNA en las células de la planta, como las histonas (H2A) (Tenea *et al.*, 2009), y las enzimas para la recombinación y reparación del DNA (DNA ligasa IV) (Mysore *et al.*, 2000; Friesner *et al.*, 2003).

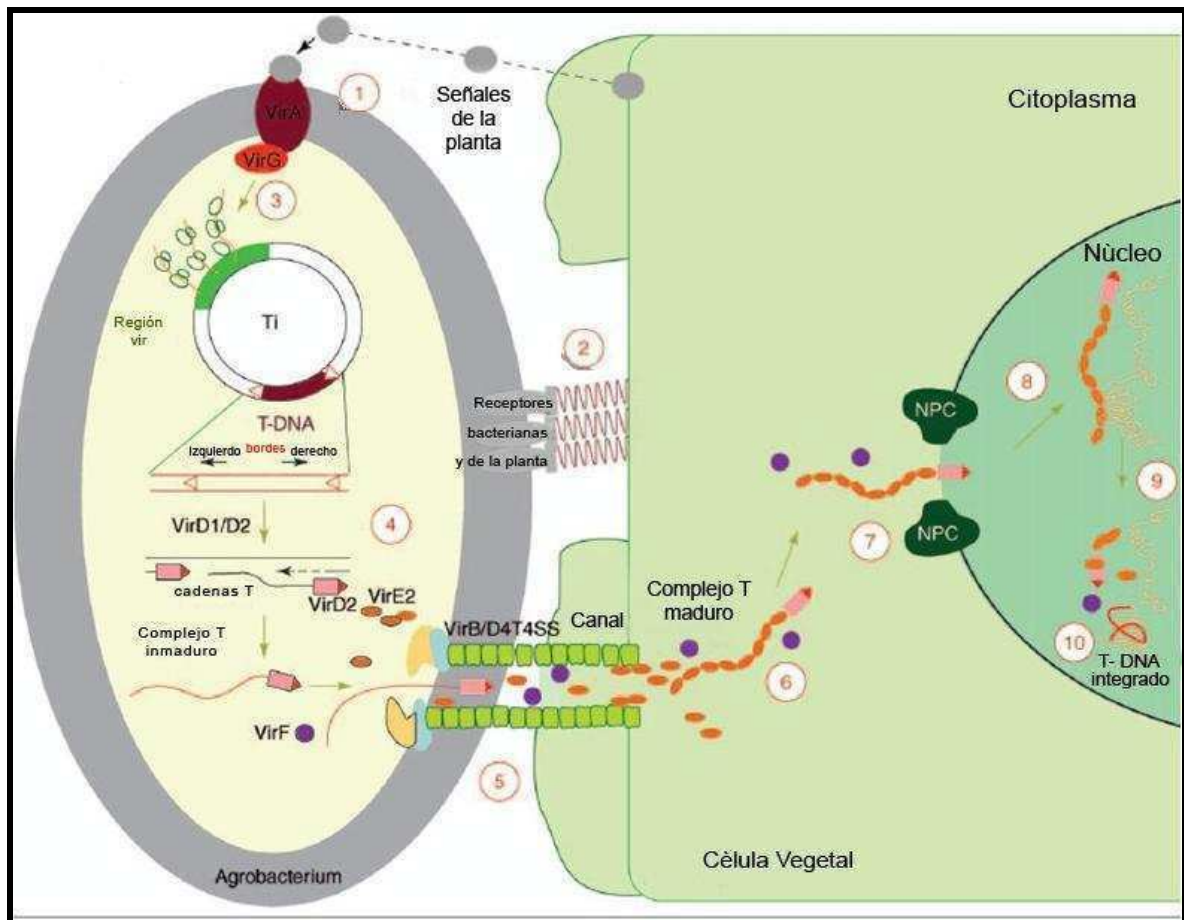


Figura 4.- Mecanismo de infección de *Agrobacterium*. 1) Reconocimiento de una célula vegetal susceptible, 2) Unión de la célula vegetal a la bacteria, 3) Inducción de la expresión de los genes *Vir*, 4) Producción de una copia transferible del T-DNA, 5) Transferencia del *complejo T* a la célula vegetal, 6) Transporte del *complejo T* en el citoplasma de la célula vegetal, 7), 8) y 9) Entrada del *complejo T* al núcleo, y 10) Integración del T-DNA en el genoma nuclear de la planta. (Modificado de Tzfira y Citovsky, 2008).

2.2.2.7 Expresión de los genes del T-DNA

Una vez que las copias del T-DNA se insertan establemente en el genoma vegetal, se transmiten a las células hijas mediante meiosis o mitosis, comportándose como un locus más de la planta y confiriéndole el fenotipo transformado a las células hospederas (Spielman y Simpson, 1986).

Una vez integrado, los genes del T-DNA se expresan en altos niveles ya que contienen señales de transcripción eucariota (Chilton *et al.*, 1980; Willmitzer *et*

al.,1983). De este modo, se transcriben los dos grupos de genes caracterizados: los *oncogenes* (*onc*) y los *genes de síntesis de opinas* (*ops*). Los *oncogenes* son los responsables de la síntesis anormal de fitohormonas, principalmente auxinas y citoquininas, que a su vez permiten una diferenciación anormal de las células y provocan la aparición del tumor, mientras que los *genes de síntesis de opinas* son aquellos que codifican enzimas que hacen que la planta produzca aminoácidos especializados llamados opinas, los cuales son una fuente de energía específica para la bacteria (Hong *et al.*, 1997).

En la naturaleza, los *onc* expresados por *Agrobacterium* son:

- ***iaaM*** e ***iaaH***, quienes dirigen la conversión del triptófano vía indolacetamida a la auxina “ácido indolacético” (Inzé *et al.*, 1984; Schroder *et al.*, 1984; Thomashow *et al.*,1984).
- ***ipt*** o ***tmr*** cuyo producto condensa isopentenil pirofosfato y AMP, que convierten en isopentenil-adenosina, una citoquinina (Akiyoshi *et al.*, 1984; Barry *et al.*, 1984).
- El producto del ***gen 5***, el cual dirige la síntesis de *indol-3-lactato*, un análogo antagonista de auxinas, y que además limita su producción por debajo de los niveles tóxicos de esta hormona (Körber *et al.*, 1991).
- El ***gen 6a***, el cual codifica una permeasa que transporta las opinas a través de membranas (Messens *et al.*, 1985) y,
- El ***gen 6b***, encargado de aumentar la sensibilidad de las células de la planta a las fitohormonas de forma aún desconocida (Hooykaas *et al.*, 1988), pero que puede estar involucrado en la respuesta hormonal (Wabiko y Minemura, 1996).

El segundo grupo de genes transferidos, los *ops* dirige la producción de opinas, y dependiendo del tipo de plásmido se han descrito distintos genes (Tempé y Goodman, 1982; Ellis *et al.*, 1984; Dessaux *et al.*, 1986), aquí mencionamos alguno de ellos y las enzimas que codifican:

- ***nos*** – nopalina sintetasa
- ***acs*** – agrocinopina sintasa
- ***ocs*** – octopina sintetasa

- **ags** – agropina sintetasa
- **mas 1'** y **mas 2'** – manopina sintetasa

2.3 Transferencia Horizontal de genes (HGT)

Los genes son regularmente transmitidos verticalmente dentro de un linaje, de una generación a la próxima, sin embargo también pueden ser intercambiados entre linajes por transferencia horizontal de genes (HGT) (Denker *et al.*, 2008). La HGT, también conocida como transferencia de genes lateral (LGT), es un proceso en el que un organismo transfiere material genético a otra célula que no es descendiente.

2.3.1 HGT en bacterias

La HGT es común entre las bacterias, éstas han obtenido una fracción significativa de su diversidad genética a través de la adquisición de secuencias de genes de otras bacterias alejadas filogenéticamente. La transferencia horizontal de genes produce genomas extraordinariamente heterogéneos y dinámicos, en los que cantidades importantes de DNA son incorporadas y eliminadas del cromosoma. Las transferencias laterales han cambiado, por tanto, la ecología y la patogenicidad de las especies bacterianas, promoviendo la diversificación y especiación microbiana. Por medio de la transferencia horizontal de genes, las bacterias son capaces de adquirir resistencia a diferentes antibióticos, capacidades virulentas, y diferentes propiedades metabólicas que les permiten explorar nuevos hábitats (Maiden 1998; Gogarten *et al.*, 2002; Ochman *et al.*, 2000).

Existen tres mecanismos fundamentales mediante los que las bacterias son capaces de adquirir nuevos fragmentos de DNA: **transformación**, mediante la cual la bacteria capta DNA desnudo del entorno, lo cual permite la transmisión de material genético entre especies muy distantes; **transducción**, mecanismo por el cual un bacteriófago transfiere fragmentos de DNA de una bacteria a otra; y **conjugación**, el único proceso que requiere contacto físico entre las dos bacterias que se transfieren así el material genético (Madigan *et al.*, 1999).

2.3.1 HGT en eucariotas

La transferencia de genes bacterianos a genomas de eucariotas parece estar facilitada por endosimbiontes, desde las mitocondrias y plastos (Gupta, 2000), pasando por los bien conocidos procesos de transmisión bacteriana a algunos hongos como *Saccharomyces* o la bacteria *Wolbachia pipientis* en la línea germinal de algunos eucariotas (Nikoh *et al.*, 2008). En el 2007, Hotopp *et al.*, examinaron los genomas de los hospedadores de la bacteria *Wolbachia pipientis* para evidenciar eventos de transferencia horizontal de genes entre estos organismos. Los resultados experimentales obtenidos confirman la transferencia horizontal en los genomas de cuatro insectos y cuatro nematodos, en cantidades que oscilan desde pequeñas inserciones (menos de 500 pares de bases) hasta el genoma entero del parásito (más de 1 megabase). Además, se pudo conocer que algunos de estos genes de *Wolbachia* son transcritos en las células eucariotas que carecen de endosimbiontes, lo que indica que los genes transferidos horizontalmente son heredables, proporcionando así un mecanismo para la adquisición de nuevos genes y funciones que puede representar un importante impulso evolutivo. En concreto, de los 1206 genes de *Wolbachia*, al menos 28 están activos después de su inserción en el genoma de la mosca *Drosophila ananassae*, aunque aún no está claro si codifican proteínas.

También se ha encontrado evidencias de transferencia horizontal de genes bacterianos a rotíferos de la clase *Bdelloidea*, tal como lo demuestran los resultados obtenidos por Gladyshev *et al.*, 2008. En este trabajo se reporta la presencia de genes provenientes de diferentes organismos, tales como bacterias, hongos y plantas, en el genoma de estos rotíferos, los cuales parecen concentrarse a lo largo de las regiones teloméricas con algunos elementos genéticos móviles. Algunos de estos genes foráneos son defectivos mientras que otros se mantienen intactos y se transcriben; la captura y la asimilación funcional de estos genes exógenos pueden representar una fuerza importante en la evolución de los rotíferos de la clase *Bdelloidea*.

2.3.1.1 HGT en plantas

En plantas, el modelo mejor conocido de transferencia horizontal de genes es el del género *Agrobacterium*. En las primeras investigaciones de

transformación de plantas por este género muchos investigadores creyeron que no había homología significativa entre las secuencias del T-DNA y el genoma de la planta. Sin embargo, estudios posteriores revelaron que el genoma de algunas plantas contienen secuencias similares a las del T-DNA de *Agrobacterium*.

De esta manera, White *et al.*, 1983 detectaron una región homóloga al T-DNA del plásmido Ri de *Agrobacterium rizhogenes* en el genoma de *Nicotiana glauca* y llamaron a este DNA, T-DNA celular (*T-DNAc*). Posteriormente, Furner *et al.*, 1986 confirmaron este descubrimiento analizando diferentes variedades de *N. glauca* y confirmaron su presencia en por lo menos cuatro especies más: *N. Otophora*, *N. tomentosiformis*, *N. tomentosa* y *N. benavidesii*. Ellos determinaron la secuencia de la región *rolB-C* e identificaron dos genes *rol*, llamados *NgrolB* y *NgrolC* (*Ng* por *N. glauca*) y además sugirieron que el *T-DNAc* fue resultado de la infección temprana de *Agrobacterium* en la evolución del género *Nicotiana*.

Diez años más tarde, Meyer *et al.*, en 1995 amplificaron del genoma de *N. tabacum* (cv. Havana 425) secuencias homólogas a los genes pRiA4 *rolB*, *rolC* y *orf13* (llamados *trolB*, *trolC* y *torf13*, respectivamente). Ellos también amplificaron las regiones intergénicas de estos genes y sugirieron que el genoma del tabaco posee al menos una copia de los loci *rolB*, *rolC* y *orf13*.

Estos hallazgos también han servido para elucidar algunas incógnitas acerca del linaje de *N. tabacum*; siendo esta es una especie anfidiplóide, es decir un híbrido natural, originado a partir de dos ancestros muy cercanamente relacionados a las actuales especies *N. silvestre* y *N. tomentosiformis*. El análisis de Southern blot llevado a cabo por Meyer *et al.*, en 1995 demostró que el gen *trolC* deriva del ancestro *N. tomentosiformis*, sugiriendo ello que el *T-DNAc* ha sido el resultado de la transferencia de DNA entre *A. rizhogenes* y un progenitor moderno del tabaco.

Trabajos más reciente como el de Suzuki *et al.*, (2002) y el de Intrieri y Buiatti (2001) confirmaron la presencia de homólogos a los genes *mis* y *orf14* en otras especies del género *Nicotiana* (mediante análisis de DNA gel blot y PCR), demostrando de esta manera que el *T-DNAc* no está limitado a la especie *N. glauca*.

La existencia de secuencias similares al T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium* no ha sido restringida al género *Nicotiana*, la presencia de estas secuencias también han sido reportada en otros genomas de plantas. Análisis de Southern blot indican que *Daucus carota* “zanahoria” contiene secuencias homólogas al T-DNA de pRi1855 (Spano *et al.*, 1982) y *Convolvus arvensis* al T-DNA de pRi8196 (Tepfer, 1984). Sin embargo, los datos obtenidos no son concluyentes y se hace necesario desarrollar más experimentos que permitan confirmar estos resultados.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico:

- Plantas de *Ipomoea batatas* (L.) Lam (6x) cultivar Huachano, con código CIP N° 420065, obtenidas de la Colección Libre de Patógenos del Banco de Germoplasma del Centro Internacional de la Papa (CIP).
- Plantas de 86 cultivares de *Ipomoea batatas* (L.) Lam (6x) (adicionales a Huachano) pertenecientes a diferentes partes del mundo obtenidas de la Colección Libre de Patógenos del Banco de Germoplasma del CIP (Anexo N°1).
- Plantas de 5 entradas de *Ipomoea batatas* (L.) Lam (4x) obtenidas de la Colección Libre de Patógenos del Banco de Germoplasma del CIP (Anexo N°2).
- Plantas de *Ipomoea trifida* (2x) obtenidas de la Colección Libre de Patógenos del Banco de Germoplasma del CIP, código CIP N° 430406.
- Plantas de *Ipomoea tabascanana* (4x) obtenidas de la Colección Libre de Patógenos del Banco de Germoplasma del CIP, código CIP N° 460824.
- Plantas de *Solanum tuberosum* cultivar Desireé, obtenidas de la Colección Libre de Patógenos del Banco de Germoplasma del CIP, con código CIP N° 800048.

3.1.2 Herramientas bioinformáticas:

- Secuencias nucleotídicas parciales homólogas a la región del T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, obtenidas de plantas de camote por secuenciación de alto rendimiento de pequeños RNAs de interferencia (*small interference RNA*) “*siRNAs*” mediante la tecnología Solexa/Illumina (Kreuze *et al.*, 2009).

- Secuencias nucleotídicas depositadas en la base de datos GenBank correspondiente a genes del T-DNA del plásmido Ti de cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium vitis*, del T-DNA del plásmido Ri de *Agrobacterium rizhogenes* y de genes homólogos a *iaaH* e *iaaM* en *Pseudomonas syringae* (Anexo N°3).

3.1.3 Software de análisis de datos:

- VectorNTI 11.0 (Invitrogen, USA)
- MEGA 5.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software Version 5.0, Center for Evolutionary Functional Genomics, The Biodesign Institute, Arizona State University, USA).
- DNASTar (DNASTAR, Inc. USA)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Amplificación y clonación de los genes *Acs*, *C*, *iaaH*, *iaaM* y sus respectivas regiones intergénicas mediante PCR.

3.2.1.1 Extracción de DNA genómico.

Se realizó el protocolo de extracción de DNA genómico a pequeña escala a partir de hojas de *Ipomoea batatas* (L.) Lam (6x) y (4x), *Ipomoea trifida* (2x) e *Ipomoea tabascana* (4x) y de *Solanum tuberosum* cv. Desiré “papa” (control negativo). Se utilizó el método de Bromuro de cetil-trimetilamonio “CTAB” (Anexo N°5) con algunas modificaciones descritas a continuación (Manual de Protocolos CIP, 2006): se trituró 200mg de tejido vegetal procedente de hojas en un tubo eppendorf conteniendo la mezcla de 700µL de CTAB más 2µL de β-mercaptoetanol. El tejido triturado fue homogenizado en vortex durante 2 minutos e incubado a 65°C durante 30 minutos. Luego se enfrió a temperatura ambiente durante 5 minutos y se le agregó 900µL de la mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó y centrifugó en frío (4°C) a 14000 rpm durante 10 minutos. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo agregándosele 240µL de isopropanol y se incubó a -20°C durante 20 minutos. Nuevamente se centrifugó en frío (4°C) a 14000 rpm durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue secado a temperatura ambiente. El pellet seco fue lavado con

etanol de 70 y 100% para posteriormente ser resuspendido en 150µL de agua libre de nucleasas (NFW).

Para la purificación del DNA genómico se agregó 150µL de la mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó en frío (4°C) a 14000rpm durante 5 minutos. Se transfirió el sobrenadante y se agregó 15µL de acetato de sodio 3M pH 5.0, se homogenizó e incubó durante 1 hora a -20°C. Se centrifugó, descartó el sobrenadante y dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente el pellet se resuspendió en 100µL de NFW e incubó con 5µL de RNasa (10 mg/ml) a 37°C durante 1 hora. Las muestras obtenidas fueron conservadas a -20°C.

La cuantificación de la concentración del DNA genómico, se realizó mediante observaciones de la corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X (Anexo N° 6), utilizándose 1µL de DNA y 9µL de buffer de carga SALB 1X (Anexo N°6) y comparándose con el marcador de peso molecular λ /PstI. Además, los datos obtenidos fueron corroborados con mediciones en el espectrofotómetro (Nanodrop). La concentración final se estimó en ng/µL.

3.2.1.2 Diseño y optimización de iniciadores

Se diseñaron iniciadores específicos para los 4 genes (Triptófano 2-Monooxigenasa *iaaM*, indol-3-Acetoamida Hidrolasa *iaaH*, Agrocinoquina Sintasa *Acs* y gen C) y sus respectivas regiones intergénicas a partir del alineamiento de secuencias de *siRNAs* de camote previamente obtenidas (Kreuze *et al.*, 2009) con las secuencias disponibles en el Genbank: *Agrobacterium tumefaciens str. C58* plasmid Ti y *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTi Sakura DNA. Los iniciadores fueron diseñados con la ayuda del software Vector NTI 11.0 (Invitrogen, USA).

3.2.1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

Antes de llevar a cabo la amplificación de los fragmentos de interés se realizó un PCR control para verificar la calidad del DNA extraído en las reacciones de PCR. Para ello se emplearon los iniciadores MDH-H968 y MDH-1163 (Li *et al.*, 2004) que amplifican el gen de la Malato Deshidrogenasa (MDH) específico para especies del género *Ipomoea*.

La amplificación de los 4 fragmentos correspondientes a los genes *iaaM*, *iaaH*, *Acs* y *C* y sus respectivas regiones intergénicas fueron llevadas a cabo utilizando el kit GoTaq™ DNA Polymerase (Promega). Cada mezcla de reacción contenía 5µL de Buffer PCR 5X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9.0), 2.5µL de MgCl₂ (25mM), 0.5µL de cada desoxinucleótido trifosfato *dGTP*, *dATP*, *dTTP*, y *dCTP* (10mM), 0.5µL de cada iniciador sentido y antisentido (10uM), 0.2µL de GoTaq DNA polimerasa (2.5U/µL), 1µL de DNA genómico (100ng/µL) y completado a 25µL de reacción con NFW. Las condiciones de reacción variaron según el tamaño de fragmento, la temperatura de fusión (*melting temperature*) “*T_m*” de los distintos iniciadores (X) y tiempos de extensión (Y); resumiéndose de la siguiente manera: 95°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30s, X°C por 30s y 72°C por Ys, y luego una elongación final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1% y los fragmentos de interés recuperados utilizando el kit Wizard SV de Extracción de gel (Promega) según las especificaciones de la compañía.

3.2.1.4 Ligación y clonación de fragmentos de PCR:

El DNA recuperado fue ligado en un vector plasmídico pGem-T Easy (Promega) siguiendo las especificaciones de la compañía: se mezcló 5µL de Buffer 2X de Ligación (60mM Tris-HCl, pH 7.8, 20mM MgCl₂, 20mM DTT, 2mM ATP, 10% polietilen glicol), 1µL del vector pGem-T Easy (50ng/µL), 1µL de la enzima T4 DNA ligasa (3 unidades Weiss/µL) y 3µL de producto de PCR (100ng/µL), e incubó a 4°C durante toda la noche. El plásmido cuenta con dos sitios de corte restricción con la enzima *EcoRI* para la comprobación de la inserción del fragmento deseado (Figura 5).

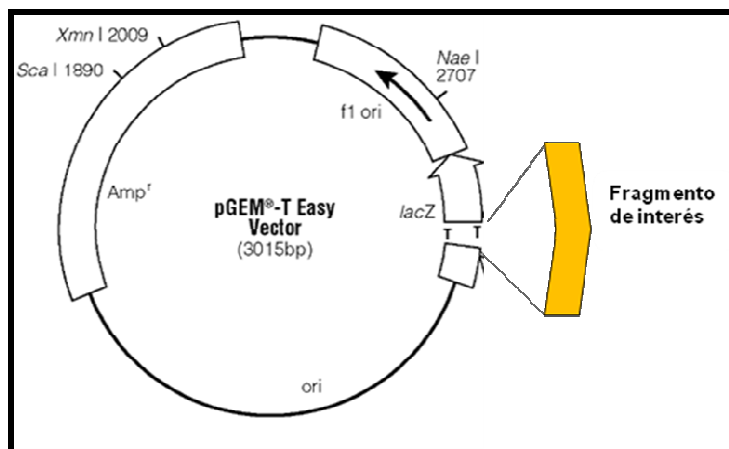


Figura 5.- Esquema de los eventos de ligación de los fragmentos obtenidos mediante PCR en el plásmido pGem-T Easy (Promega).

El fragmento ligado fue luego introducido en la *E. coli* DH5 α mediante transformación por golpe de calor según los siguientes pasos: se mezcló el producto de la ligación y 100 μ L de cultivo bacteriano durante 30 min a 4°C. Luego se incubó la mezcla durante 1 minuto a 42°C y rápidamente se volvió a incubar a 4°C durante 5 minutos. Se agregó medio SOC (Sigma-Aldrich) enriquecido con glucosa y dejó incubando a 37°C durante una hora. En este lapso de tiempo, se preparó placas de cultivo con Ampicilina 100ppm, conteniendo 25 μ L de IPTG 100mM y X-Gal 100mM cada una. Se sembró el cultivo líquido por diseminación e incubó a 37°C toda la noche. Al día siguiente, se seleccionó las colonias blancas conteniendo el inserto y cultivó en medio LB líquido conteniendo 100 ppm Ampicilina a 37°C todo la noche. La extracción de plásmidos conteniendo el fragmento de interés se realizó utilizando el Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega).

3.2.1.5 Análisis de restricción

El DNA plasmídico obtenido en el paso anterior fue sometido a un análisis de restricción con el fin de comprobar la presencia de los fragmentos clonados en el vector. Para ello se digirió 1 μ L de DNA plasmídico con la enzima de restricción *EcoRI* (Biolabs New England) durante dos horas a 37°C. Las muestras digeridas fueron luego sometidas a una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% y los fragmentos obtenidos fueron visualizados mediante el uso del transiluminador UV.

3.2.1.6 Secuenciación y ensamblaje de los fragmentos obtenidos

La secuenciación de los plásmidos conteniendo el fragmento deseado fue realizada con los iniciadores estándar M13 (sentido y antisentido) y fue llevada a cabo por la compañía MacroGen (Korea). Se enviaron a secuenciar al menos tres clones individuales por cada gen y región intergénica, si eran detectados conflictos se secuenciaban nuevos clones. En caso de *gaps* inesperados, el fragmento fue reamplificado y re-secuenciado. Las secuencias sentido y antisentido fueron obtenidas en los formatos: abi, txt, phd.1 y pdf, y ensambladas en secuencias consenso tomando como molde la secuencia completa del genoma de *Agrobacterium tumefaciens str.58* plasmid Ti y con la ayuda del programa Seqman, que está incluido en el paquete bioinformático DNASTAR (DNASTAR Inc., USA). Posteriormente, las secuencias consensos fueron alineadas con otras secuencias nucleotídicas homólogas de la base de datos del GenBank mediante el uso del programa BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

3.2.2 Amplificación y clonación de secuencias nucleotídicas “no conocidas” mediante *PCR-Genome Walker*.

Debido a que las secuencias nucleotídicas previamente obtenidas para los 4 genes: *iaaM*, *iaaH*, *Acs*, *C* y sus respectivas regiones intergénicas no formaron un solo *contig* se diseñó una estrategia que nos permitiera ensamblarlas juntas y además obtener información acerca de las secuencias adyacentes a éstas. Con este fin se desarrolló el *PCR-Genome Walker* (Clontech, 2007), una técnica molecular que permite identificar secuencias de DNA genómico no conocidas adyacentes a secuencias conocidas. El protocolo desarrollado se basó en el empleado por Sierbert *et al.*, (1995) con algunas modificaciones descritas a continuación: se construyeron “bibliotecas” de fragmentos de DNA genómico (no clonados) ligados a un adaptador “*Genome Walker adaptor*”, conocidos como “*Bibliotecas Genome Walker*”, a través de un paso previo de digestión con enzimas de restricción. Posteriormente, se llevaron a cabo dos amplificaciones por *PCR-Touchdown* para cada librería. En el PCR primario se empleó un iniciador correspondiente a la región externa del adaptador denominado AP1 y otro iniciador externo específico a la región adyacente conocida. En el PCR

secundario o *PCR-Nested*, se empleó un iniciador correspondiente a la región interna del adaptador denominado AP2 y otro iniciador interno específico a la región adyacente conocida. El protocolo esquemáticamente se muestran en la Figura 6.

3.2.2.1 Diseño de iniciadores

Para el diseño de los iniciadores específicos (externos e internos) de las regiones adyacentes conocidas se empleó el software Vector NTI 11, estas regiones adyacentes incluían las secuencias correspondientes a los extremos *iaaM*, *Acs* y *C*. Las secuencias de los iniciadores correspondientes al adaptador y el mismo adaptador fueron reportadas previamente y adquiridas a partir del kit *PCR-Genome Walker* (Clontech, USA) (Tabla N°1). Se evaluaron *in silico* la formación de dímeros, heterodímeros y estructuras secundarias entre los iniciadores específicos y los iniciadores del adaptador mediante el programa Vector NTI 11.0.

Tabla 1.- Iniciadores del Adaptador

<i>Iniciador</i>	<i>Secuencia nucleotídica</i>	<i>Melting Temperature "Tm" (°C)</i>
ADP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC	59.0
ADP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT	71.0

3.2.2.2 Construcción de *Bibliotecas Genome Walker*

Para la construcción de las cuatro *Bibliotecas Genome Walker* se digirió DNA genómico de *Ipomoea batatas* (L.) Lam cv. Huachano (100ng/μL) con las enzimas de restricción: *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* y *StuI* (New England Biolabs), cuyas características se encuentran descritas en la Tabla 2. Luego de revisar la calidad de las digestiones las muestras fueron purificadas con acetato de potasio (C₂H₃O₂K) 3M pH 5 y etanol 95%. Seguidamente los fragmentos de DNA

digeridos con cada enzima fueron ligados a un adaptador "*Genome Walker adaptor*" (Clontech, 2007) siguiendo las especificaciones de la compañía: se mezcló 4µL de producto digerido, 1.9µL de adaptador (25uM), 1.6µL de buffer de ligación 10X (300mM Tris-HCl, pH 7.8 a 25°C, 100mM MgCl₂, 100mM DTT y 10mM ATP), 1µL de la enzima T4 DNA ligasa (6 unidades Weiss/µL) e incubó a 16°C durante toda la noche. Al día siguiente se detuvo la reacción a 70°C por 5 minutos y se completó a un volumen final de 100µL con buffer TE (10/1, pH 7.5).

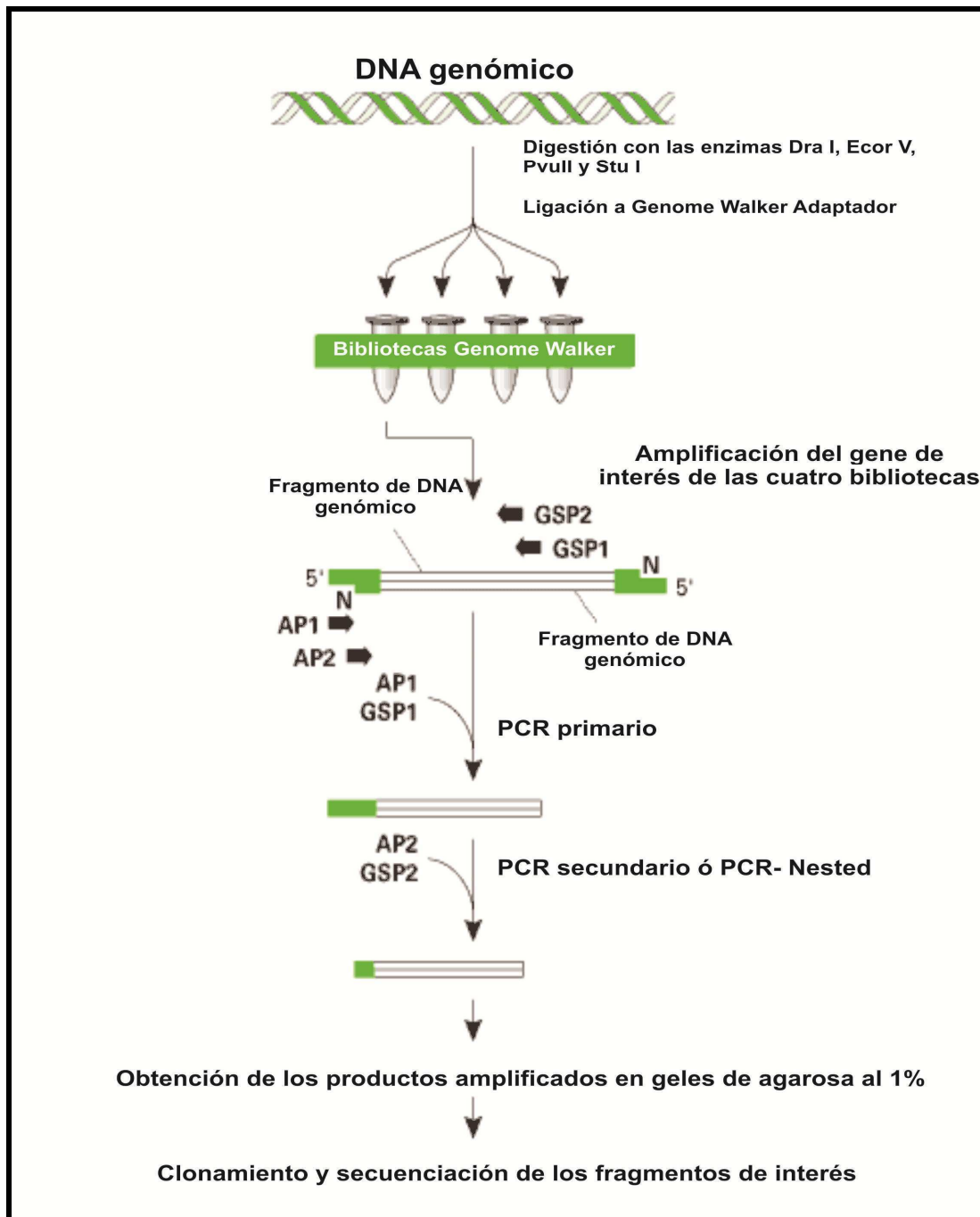


Figura 6.- PCR-Genome Walker. El DNA genómico es digerido con enzimas de restricción de corte poco frecuente, y los fragmentos resultantes son ligados a un adaptador de secuencia conocida generándose las denominadas *Bibliotecas Genome Walker*. Estas son posteriormente amplificadas por *PCR- Nested* usando iniciadores específicos y caracterizadas mediante clonamiento y secuenciamiento.

Tabla 2.- Características de las enzimas de restricción usadas para la construcción de *Bibliotecas Genome Walker*

<i>Enzima</i>	<i>Motivo</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Extremos generados</i>
<i>Dra I</i>	TTT/AAA	37°C	Romos
<i>EcorV</i>	GAT/ATC	37°C	Romos
<i>Pvu II</i>	CAG/CTG	37°C	Romos
<i>Stu I</i>	AGG/CCT	37°C	Romos

3.2.2.3 PCR-Touchdown

El *PCR-Touchdown* es una variante de la técnica de PCR que se emplea cuando se quiere incrementar la especificidad de la reacción, ello implica el uso de una temperatura de hibridación/extensión que es varios grados más alta que el T_m de los iniciadores durante los ciclos iniciales. Aunque la hibridación de los iniciadores (y amplificación) es menos eficiente a estas altas temperaturas, esto resulta más específico. La temperatura de hibridación/extensión es luego reducida ligeramente por debajo del T_m de los iniciadores para los ciclos restantes, permitiendo la amplificación eficiente y exponencial de los productos gen-específicos.

En el caso del protocolo empleado se lleva a cabo un PCR secundario o *PCR-Nested* adicional con el fin de incrementar la sensibilidad de la técnica.

3.2.2.3.1 PCR primario

El PCR primario se llevó a cabo utilizando el kit *PfuUltra™ II Fusion HS* DNA Polymerase con algunas modificaciones descritas a continuación: Se mezcló 5µL de buffer 10× *PfuUltra™ II Reaction*, 0.5µL de cada desoxinucleótido trifosfato *dGTP*, *dATP*, *dTTP*, y *dCTP* (25mM), 1µL de cada iniciador sentido y antisentido (10uM), 0.5µL de *PfuUltra™ II Fusion HS* DNA Polimerasa, 1µL del producto de la ligación y se completó con NFW el volumen final de la reacción a 50µL. Las condiciones del programa variaron según la gradiente de T_m de los distintos

iniciadores (X) y se resumieron de la siguiente manera: 94°C por 2 min, seguida de 7 ciclos de 94°C por 25s y X°C por 3min, 32 ciclos de 94°C por 25s y X°C por 3min y 1 ciclo final de X°C por 7 min. Los productos de PCR de la gradiente de *Tm* fueron separados mediante una corrida electroforética en geles de agarosa al 1%.

3.2.2.3.2 PCR secundario (Nested)

Las mezclas de reacción fueron preparadas bajo las mismas condiciones que en el PCR primario, excepto por los iniciadores sentido y antisentido. Además, se utilizó como muestra la dilución 1/50 del producto amplificado en el PCR primario. Al igual que en el paso anterior las condiciones del programa variaron según la gradiente de *Tm* de los distintos iniciadores (X), las cuales se resumieron de la siguiente manera: 94°C por 1 min, seguida de 5 ciclos de 94°C por 25s y X°C por 3min, 25 ciclos de 94°C por 25s y X°C por 3min y 1 ciclo final de X°C por 7 min. Los productos de PCR de la gradiente de *Tm* fueron separados en geles de agarosa al 1% y los fragmentos de interés recuperados utilizando el kit Wizard SV de Extracción de gel (Promega) según las especificaciones de la compañía.

3.2.2.4 Ligación, clonación y secuenciación de los fragmentos de interés

Los fragmentos de DNA recuperados fueron ligados al vector plasmídico pGem-T Easy (Promega), luego estos plásmidos fueron introducidos en la bacteria *E. coli* DH5 α mediante transformación por golpe de calor, luego cultivados en medio de cultivo SOC, extraídos con el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega) y digeridos con la enzima de restricción *EcoRI* (Biolabs New England) para confirmar la presencia de los fragmentos de interés. Finalmente, los clones seleccionados fueron enviados a secuenciar a Macrogen (Korea).

3.2.3 Análisis filogenético

3.2.3.1 Secuencia completa

La organización genómica de los genes del T-DNA hallados fue construida con el programa Vector NTI 11.0 y comparada con la de cepas de *A. tumefaciens* y *A. vitis*, manualmente.

3.2.3.2 Genes individuales

La búsqueda de genes homólogos a *Acs*, *C*, *iaaH* e *iaaM* se realizó con la opción *tBLASTx* del servidor <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>. Solo se consideraron *hits* de secuencias de *Agrobacterium* que tengan un *query coverage* mínimo de 55% y un e-value de al menos e^{-50} . El alineamiento de las secuencias obtenidas se realizó con el programa clustal W del paquete bioinformático MEGA 5, las secuencias fueron editadas y revisadas manualmente.

Las relaciones filogenéticas entre las secuencias obtenidas de los genes del T-DNA de camote y de otras cepas del género *Agrobacterium* fueron establecidas mediante la reconstrucción de árboles filogenéticos utilizando los modelos de sustitución nucleotídica que mejor se adecuaron para cada alineamiento. Para determinar la elección de dichos modelos se utilizó la opción *Model selection* (ML) del programa MEGA 5 la cual presenta 24 modelos tentativos los que se valoraron utilizando el criterio bayessiano (BIC). El método de reconstrucción utilizado fue el de *Neighbor-Joining*. Tanto el método de reconstrucción filogenética como los modelos de sustitución nucleotídica elegidos se encontraron disponibles en el programa MEGA 5. La confiabilidad de los árboles fue evaluada mediante pruebas de *bootstrap* (valor estadístico que estima el nivel de confianza de una relación filogenética inferida) de 1000 repeticiones en todos los casos.

3.2.4 Hibridación por *Southern Blot*

La hibridación es una técnica que consiste en la asociación de una hebra de ácidos nucleicos con otra hebra complementaria marcada (sonda) a fin de visualizar la formación de moléculas de doble hebra de DNA. Esta técnica resulta muy específica debido a la complementariedad de las hebras de los ácidos nucleicos, por esto es una de las más empleadas en biología molecular.

La hibridación por *Southern Blot* fue desarrollada por Edwin Southern en 1975 y consiste en la transferencia de los fragmentos de DNA de un gel de agarosa previamente separados por electroforesis a una membrana. En la transferencia, los ácidos nucleicos desnaturalizados son inmovilizados sobre un soporte inerte o matriz (membrana) de tal manera que se evita la rehibridación de

las secuencias dentro de la muestra, no perdiendo su capacidad de hibridación. La inmovilización del ácido nucleico generalmente es seguida de un proceso de fijación (luz ultravioleta) empleado para aumentar la sensibilidad del sistema. Debido a que se pueden emplear diversos tipos de membranas para la inmovilización y fijación de los ácidos nucleicos, las matrices más adecuadas para la mayoría de aplicaciones son los filtros de nylon y nitrocelulosa.

Una vez transferido y desnaturalizado el DNA, se realiza la hibridación empleando una sonda determinada con la finalidad de verificar la presencia del gen de interés dentro del genoma de la planta, y también poder determinar el número de copias.

En el presente trabajo, la detección y marcaje de la sonda se basó en un sistema de quimioluminiscencia, en donde el DNA fue marcado con Digoxigenina (DIG) y detectado a través de la señal quimioluminiscente generada por la reacción de la fosfatasa alcalina y su correspondiente sustrato (CSPD). Este es un método no radioactivo que ofrece mayor seguridad, fácil manejo y menor peligro de contaminación.

La hibridación por *Southern blot* constó de los siguientes pasos:

3.2.3.1 Extracción de DNA genómico.

Se realizó el protocolo de extracción de DNA genómico a mediana escala (Manual de Protocolos CIP, 2006) a partir de hojas de *Ipomoea batatas* (L.) Lam (6x) y (4x), *Ipomoea trifida* (2x) e *Ipomoea tabascan*a (4x) y de *Solanum tuberosum* cv. Desiré “papa” (control negativo), con algunas modificaciones descritas a continuación: se trituró 4g de tejido vegetal procedente de hojas con nitrógeno líquido y se transfirió a tubos Falcon de 50ml conteniendo la mezcla de 20ml de CTAB más 200µL de β-mercaptoetanol. El tejido triturado fue homogenizado en vortex durante 2 minutos e incubado a 65°C durante 30 minutos. Luego se enfrió a temperatura ambiente durante 5 minutos y se le agregó 20ml de la mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó y centrifugó en frío (4°C) a 6000 rpm durante 15 minutos (2 veces). Se transfirió la fase acuosa a otro tubo agregándosele 15ml de isopropanol frío y se incubó a -20°C durante 1 hora. Se centrifugó y se transfirió el DNA a tubos Eppendorf de

2ml. Seguidamente se lavó el *pellet* con las soluciones de lavado I, II (Anexo N°5) y etanol al 75%; se centrifugó y secó a temperatura ambiente. El *pellet* seco fue resuspendido en 500µL de agua libre de nucleasas (NFW). Para la purificación y cuantificación del DNA se siguió el protocolo descrito anteriormente.

3.2.3.2 Análisis de restricción y digestión del DNA genómico

Se analizó los sitios de restricción presentes en el fragmento completo obtenido mediante el uso del programa Vector NTI 11.0 (Invitrogen, USA). El criterio de selección de la enzima se basó en la frecuencia del sitio de corte en el genoma de la planta y en el fragmento a analizar. Debido a la ausencia de la secuencia completa del genoma de camote, éste se llevó a cabo en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

Después del análisis de restricción, se digirió 30µg de DNA de cada muestra con 100 U de la enzima de restricción elegida, en un volumen final de reacción de 600µL. Se incubó las muestras a 37°C durante 24 horas y posteriormente se verificó la digestión completa mediante una corrida electroforética de 5µL de cada muestra en un gel de agarosa al 1% con TBE 1X.

Una vez verificada la digestión se procedió a concentrar las muestras en el liofilizador (SC110A Speed vac, SAVANT) con la finalidad de reducir el volumen de reacción a aproximadamente 80µL (volumen máximo de muestra/pozo de gel). Seguidamente se agregó buffer de carga 1X a cada muestra y se cargaron en un gel de agarosa al 0,8%. Adicionalmente se colocó el marcador de peso molecular λ /PstI así como también 50-80 pg de producto de PCR (sonda no marcada) como un control positivo. Las muestras fueron corridas a 30 voltios durante toda la noche. Finalizada la corrida electroforética se verificó la separación de las bandas observando el gel bajo un transiluminador de luz UV.

3.2.3.3 Transferencia Southern

Después de verificar la correcta separación de las bandas, se lavó el gel con agua destilada para eliminar los residuos de bromuro y se le sometió a un proceso de despurinación por 10 minutos en una solución de 250 ml HCl 0.25M (Anexo N°7) con 20 rpm de agitación (New Brunswick, SCIENTIFIC USA) a temperatura ambiente. Luego se hicieron dos lavados con solución

desnaturalizante (Anexo N°7) por 15 minutos con agitación suave. Seguidamente se trató el gel con solución neutralizante (Anexo N°7) a pH 8.0, el mismo tiempo y número de veces que en el paso anterior.

A continuación, los fragmentos de DNA fueron transferidos a una membrana de nylon Hybond N+ (RPN 303B, AMERSHAM), siguiendo el método de transferencia por capilaridad descrito por Southern (1975) (Figura 7).

El sistema de transferencia se armó de la siguiente manera: en una bandeja de vidrio que contenía SSC20X (Anexo N°7) se colocó un soporte de acrílico o vidrio y sobre él una tira de papel *blotting* (Hybond-N+ RPN6103M, AMERSHAM) embebido en solución SSC20X (a manera de puente). Los bordes de dicho papel fueron sumergidos en la solución de transferencia. Sobre el papel *blotting* se colocó el papel Whatman 3 MM (P-7176, SIGMA) cortado del mismo tamaño del gel y embebido en la solución de transferencia (evitando siempre que se formen burbujas). Alrededor del gel se colocó tiras de Parafilm ® para prevenir que el tampón de transferencia sea absorbido directamente por el papel toalla. Sobre el gel se colocó la membrana Hybond N+ con el papel Whatman 3MM cortado con las dimensiones del gel y encima un paquete de papel toalla (de medidas aproximadas 13 x 23 y 5cm de alto), sobre esto se colocó un peso para que exista un mejor contacto del gel con la membrana (Figura 7).

La transferencia se dejó por 18 a 20 horas. Después, se desarmó con cuidado todo el sistema y se dejó secar la membrana a temperatura ambiente sobre papel filtro por aproximadamente 2 horas. Transcurrido este tiempo se fijó el DNA a la membrana exponiéndola a luz ultravioleta a 120,000 microJoules por un tiempo aproximado de 15 segundos (Stratalinker UV Crosslinker 2400, STRATAGENE). Seguidamente la membrana fue guardada a temperatura ambiente hasta el momento de la hibridación.

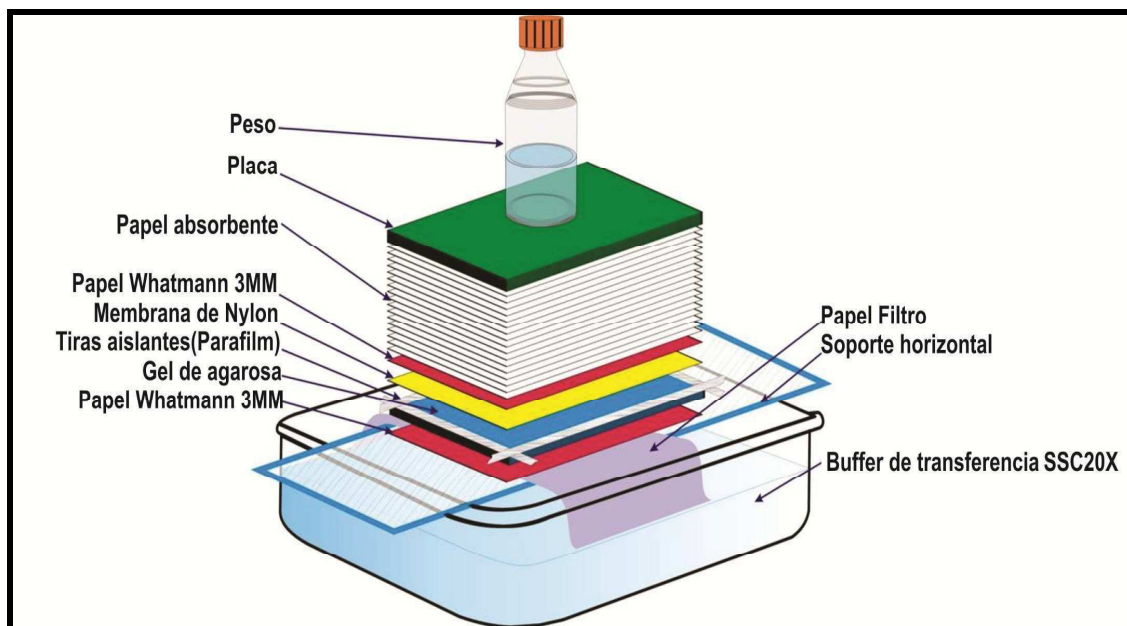


Figura 7.- Sistema de transferencia Southern (Manual CIP, 2006).

3.2.3.4 Preparación y marcaje de la sonda

Se seleccionó como sonda parte de la secuencia nucleotídica correspondiente al gen C. Para la obtención de ésta se empleó DNA genómico de camote cv Huachano. El marcaje de la sonda se realizó con DIG empleando el kit PCR DIG Probe Synthesis (Roche).

La sonda fue sintetizada usando los iniciadores Ib-Cprot3F e Ib-Cprot4R (Tabla 3) y el tamaño esperado fue de 775pb.

Tabla 3.- Iniciadores utilizados para la síntesis y marcaje de la sonda

<i>Iniciador</i>	<i>Secuencia</i>	<i>T_m (°C)</i>
Ib-Cprot3-F	CTTTGCGACTCATCCAACACGT	56.5
Ib-Cprot4-R	AATCCACTCTGTCCTTCTCGGA	54.3

La preparación de la mezcla de reacción de PCR se siguió según las recomendaciones del fabricante, con algunas modificaciones descritas a continuación: La mezcla de reacción contenía 2.5µL de Buffer PCR 10X (con MgCl₂, 15mM), 2.5µL de *PCR DIG probe synthesis* (10X), 2.5µL de cada iniciador

sentido y antisentido (10uM), 0.5µL de *Enzyme mix for PCR labeling* (3.5U/µL), 1µl de DNA genómico (100ng/µL) y completado a un volumen final de 25µL con NFW. Para esta reacción se preparó un control no marcado utilizando sólo dNTPs (10X) en lugar de *PCR DIG probe synthesis* (10X). Las condiciones de PCR se resumieron de la siguiente manera: 95°C por 2 min, seguida de 40 ciclos de 95°C por 30s, X Temperatura alineamiento (°C) por 30s y 72°C por Y (Tiempo de extensión) s, y luego una elongación final a 72°C por 10 minutos.

Para confirmar el marcaje de la sonda, se hizo una corrida electroforética de 1µL del producto amplificado y 1µL del control no marcado en un gel de agarosa al 1%.

3.2.3.5 Pre-hibridación e Hibridación

Antes de empezar ambos procesos es necesario conocer la temperatura de hibridación de la sonda con la que se va a trabajar, la cual va a depender de su contenido de Guanina y Citosina (GC). El cálculo se realizó siguiendo la siguiente ecuación:

$$T_m = 49.82 + 0.41 (\% G + C) - (600/l)$$

[l = longitud de la sonda en pares de bases]

$$T_{\text{óptima}} = T_m - (20 \text{ a } 25^{\circ}\text{C})$$

Para el proceso de pre-hibridación, se colocó la membrana en un tubo de hibridación (26 cm x 3.5 cm, AMERSHAM) con aproximadamente 15ml de la solución de pre- hibridación (DIG Easy Hyb, ROCHE) y se dejó incubar por una hora a 65°C. Este paso se realizó con el fin de evitar que la sonda hibride en lugares inespecíficos de la membrana, de tal manera que sólo la secuencia del DNA a ser hibridado quede libre para ser reconocido por la sonda.

Antes de seguir con el paso de hibridación es necesario desnaturalizar la sonda, para ello se adicionó 375ng de la sonda marcada con DIG (obtenida por PCR) en 1mL de la solución de pre-hibridación y se desnaturalizó durante 5 minutos a 95°C, seguidamente la muestra fue colocada en hielo por otros 5 minutos.

El siguiente paso fue agregar la sonda (marcada y desnaturalizada) al tubo conteniendo la membrana e incubarla a 65°C durante toda la noche. Esta etapa fue la más importante del proceso ya que fue aquí donde los fragmentos de DNA desnaturalizados de la sonda hibridaron específicamente con la secuencia complementaria de DNA inmovilizada en la membrana.

3.2.3.6 Lavados de estringencia

Seguidamente, se descartó la solución de hibridación e inmediatamente se agregó la primera solución de lavado I (Anexo N°8); se lavó dos veces durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Transcurrido el tiempo indicado se retiró la primera solución y se agregó la segunda solución de lavado II (Anexo N°8) previamente calentada a 68°C; se lavó dos veces durante 15 minutos a 68°C y en agitación.

Las soluciones empleadas en este paso permitieron remover la sonda que no hibridó con el DNA, mientras que las secuencias de DNA totalmente complementarias permanecieron unidas o hibridadas.

3.2.3.7 Detección y autoradiografías

La detección de la sonda se llevo a cabo usando el *kit* CSPD Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl) phenyl phosphate (Roche). Para este paso se siguió las especificaciones del fabricante, con algunas modificaciones descritas a continuación:

Terminados los lavados, se colocó la membrana en una bandeja limpia y se le agregó el buffer de lavado (Anexo N°8) durante 1-5 minutos, con el fin de remover los restos de las soluciones anteriores. Seguidamente se agregó la solución de bloqueo 1X (Anexo N°8) durante 30 minutos, a temperatura ambiente y en agitación constante. Ello con el objetivo de bloquear la membrana y así evitar que el anticuerpo conjugado (siguiente paso) reaccione en lugares inespecíficos, de tal manera que sólo la secuencia del DNA hibridada quede libre para su reconocimiento. Luego, se agregó la solución del anticuerpo conjugado anti-DIG (dilución 1:10,000 en solución de bloqueo 1X) y se incubó durante 30 minutos (tiempo exacto), a temperatura ambiente y en agitación constante; en este paso se da la reacción antígeno - anticuerpo conjugado que posteriormente se

evidenciará cuando la fosfatasa alcalina (parte del conjugado) actúe sobre el sustrato.

Posteriormente, se lavó la membrana nuevamente con el *buffer* de lavado (dos veces durante 15 minutos y en agitación constante) y se agregó la solución de detección (Anexo N°8) incubándola durante 5 minutos y a temperatura ambiente, con el fin de equilibrarla antes de agregar el sustrato. Seguidamente, se colocó la membrana en una bolsa plástica (con el lado de las muestras de DNA hacia arriba) y se aplicó 4ml de la solución de trabajo CSPD (sustrato) de una dilución 1:150 (en solución de detección) cubriéndola y evitando que se formen burbujas, se dejó incubando a temperatura ambiente por 5 minutos.

Finalmente, la membrana se fijó en un *cassette* de exposición (Hipercassette, AMERSHAM) y fue expuesta a una película de rayos x (RPN1678 Hyperfilm, AMERSHAM). Este último paso se realizó en el cuarto oscuro para evitar velar la película.

El *cassette* se guardó a temperatura ambiente por 24 horas. Transcurrido este tiempo se reveló la película colocándola primero en la solución de revelado Kodak GBX (SIGMA) por 2 minutos, se enjuagó con agua destilada y se lavó con fijador Kodak GBX (SIGMA) por 2 minutos. La película revelada se enjuagó en agua y se dejó secar.

IV. RESULTADOS

4.1 Amplificación y clonación de los genes *iaaM*, *iaaH*, *Acs*, *C* y sus respectivas regiones intergénicas del *T-DNA* de camote mediante PCR.

4.1.1 Extracción de DNA genómico

Las modificaciones hechas al método del CTAB resultaron ser muy efectivas para la extracción de DNA genómico a pequeña escala de hojas de *Ipomoea batatas* (L.) Lam (6x) (87 cultivares) y (4x) (5 entradas), *Ipomoea trifida* (2x) e *Ipomoea tabascana* (4x), y de *Solanum tuberosum* cv. Desireé “papa” (control negativo). La Figura 8, muestra los resultados de calidad de DNA genómico luego de correr 1µL de resuspendido final de la extracción en un gel de agarosa al 1%. La concentración de DNA obtenido varió entre 200- 300 ng/µL.

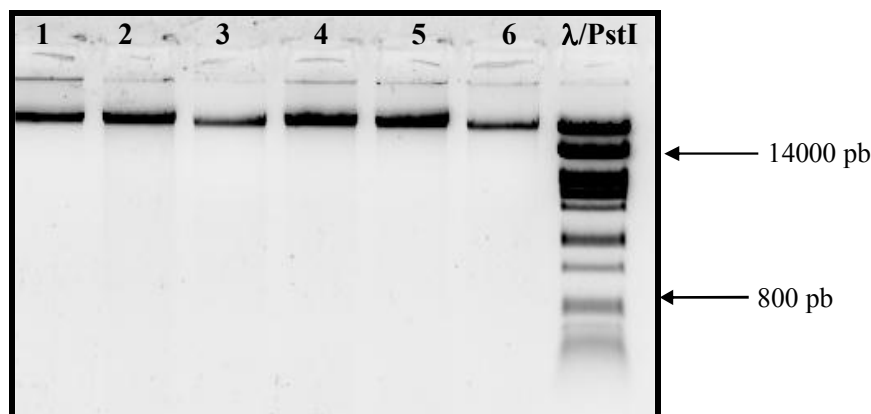


Figura 8.- Calidad del DNA genómico. Carril 1: *I. batatas* (L.) Lam (6x) cv Huachano, Carril 2: *I. batatas* (L.) Lam (6x) cv Jewel, Carril 3: *I. batatas* (L.) Lam (4x), Carril 4: *Ipomoea trifida* (2x), Carril 5: *Ipomoea tabascana* (4x) y Carril 6: *Solanum tuberosum* cv. Desireé papa; λ/PstI: marcador de tamaño molecular.

4.1.2 Diseño de iniciadores

Los iniciadores diseñados tuvieron una longitud promedio de 20-25pb y un *T_m* de aproximadamente 50°C. Se estandarizaron las condiciones de amplificación para cada par de iniciadores y se realizaron PCR con gradientes de temperatura para encontrar la temperatura de hibridación óptima para cada

reacción, tal como se muestra en la Figura 9. La Tabla 4 muestra la secuencia nucleotídica y los *T_m* calculados para cada una de los iniciadores diseñados.

Tabla 4.- Lista de iniciadores empleados para la amplificación del *T-DNA* de camote.

<i>Iniciador</i>	<i>Secuencia</i>	<i>T_m</i>
IbCprot2F	GATCAGTACGAACGCAAGCAAG	54.2
IbCprot2R	CTTGCTTGCGTTCGTA CTGATC	
IbCprot4F	TCCGAGAAGGACAGAGTGGATT	54.3
IbCprot4R	AATCCACTCTGTCCTTCTCGGA	
IbCprot5F	GTCCATTTCTTCAACGATATACG	50.2
IbCprot5R	CGTATATCGTTGAAGAAATGGAC	
IbAcs1F	AGTCAGCGATTGCAGCGGTA	55.8
IbAcs1R	TACCGCTGCAATCGCTGACT	
IbAcs3F	TGGGAAACGATAGGGACGC	54.7
IbAcs3R	GCGTCCCTATCGTTTCCCA	
IbiaaH1F	CGGCAAACCGTCTGATGTGA	56.7
IbiaaH1R	TCACATCAGACGGTTTGCCG	
IbiaaH3F	ATCGGGCTTCTAGGGTTTGGACT	58.2
IbiaaH3R	AGTCCAAACCCTAGAAGCCCGAT	
IbT2M1F	ACTCCAGACGATCTTAGCCACTTC	54.8
IbT2M1R	GAAGTGGCTAAGATCGTCTGGAGT	
IbT2M3F	CAGGAGGAGTGCTGGAGAATG	53.7
IbT2M3R	CATTCTCCAGCACTCCTCCTG	

4.1.3 Amplificación y clonación de los fragmentos de interés

En este estudio se identificaron por PCR las secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes: *C*, *Acs*, *iaaH*, *iaaM* y a las regiones intergénicas *C-iaaH* e *iaaH-T2M*. Se obtuvieron resultados positivos en los 87 cultivares de *Ipomoea batatas* (L.) Lam analizados, incluyendo el cv Huachano. Sin embargo, las muestras correspondientes a *Ipomoea trifida* (2x), *Ipomoea batatas* (L.) Lam (4x), *Ipomoea tabascana* (4x) y *Solanum tuberosum* cv Desireé “papa” (control negativo) dieron resultados negativos en todas las amplificaciones realizadas (Tabla 5). Asimismo, todas las muestras analizadas, excepto papa, dieron resultados positivos para el PCR control con el gen MDH (400pb), confirmando la calidad óptima de las muestras de DNA para las reacciones de PCR y a la vez su especificidad para el género *Ipomoea*. Las condiciones y tamaños esperados de las reacciones de PCR realizados para todos los genes y las regiones intergénicas se muestran en la Tabla 6.

Tabla 5.- Resultados de las amplificaciones por PCR de los genes y regiones intergénicas del T-DNA.

Genes/ regiones intergénicas	<i>I. batatas</i> (L.) Lam (6x) 87 cultivares	<i>I. batatas</i> (L.) Lam (4x) 5 entradas	<i>Ipomoea</i> <i>trifida</i> (2x)	<i>Ipomoea</i> <i>tabascana</i> (4x)	<i>Solanum</i> <i>tuberosum</i> “Desireé”
C- protein	+	-	-	-	-
Acs	+	-	-	-	-
iaaH	+	-	-	-	-
iaaM	+	-	-	-	-
C-prot-iaaH	+	-	-	-	-
iaaH- iaaM	+	-	-	-	-
MDH	+	+	+	+	-

Tabla 6.- Condiciones de PCR para la amplificación de las regiones génicas e intergénicas del T-DNA.

Gen / Región intergénica	Iniciadores utilizados	Condiciones de PCR			
		Tamaño esperado(pb)	Desnaturalización	Hibridación	Extensión
C	IbCprot2F IbCprot5R	1350pb	95 x 30"	51 x 30"	72 x 1'21"
Acs	IbAcs1F IbAcs3R	854pb	95 x 30"	55 x 30"	72 x 53"
iaaH	IbiaaH1F IbiaaH3R	1199pb	95 x 30"	55 x 30"	72 x 1'15"
iaaM	IbT2M1F IbT2M3R	1777pb	95 x 30"	54 x 30"	72 x 1'48"
C – iaaH	IbCprot5F IbiaaH1R	650pb	95 x 30"	55 x 30"	72 x 40"
iaaH – iaaM	IbiaaH3F IbT2M1-R	869pb	95 x 30"	55 x 30"	72 x 53"

En la Figura 9 se puede apreciar la amplificación por PCR del gen *C* usando los iniciadores IbCprot2F e IbCprot5R. La gradiente de temperatura generada fue desde 46 a 54°C. Se puede observar que conforme se incrementa la temperatura se disminuye la presencia de bandas inespecíficas obteniéndose a partir de 51°C de temperatura un solo producto amplificado del tamaño esperado (1347pb).

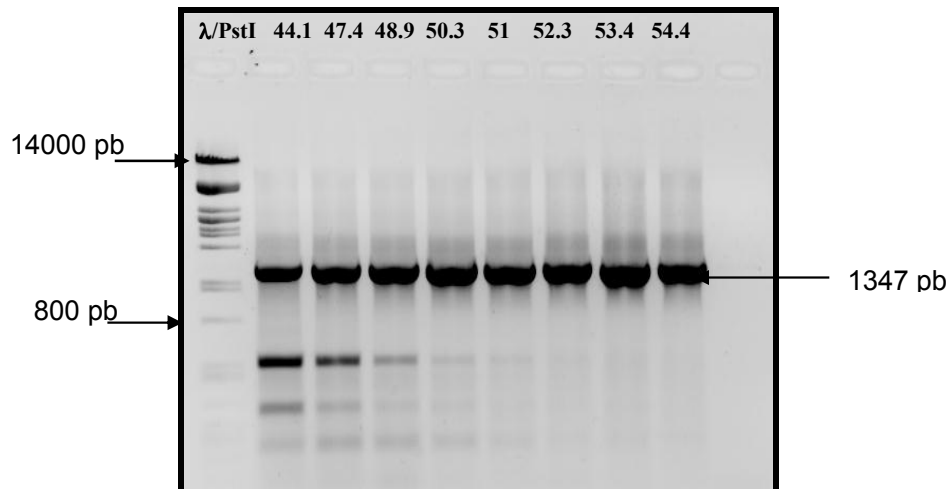


Figura 9.- Gradiente de PCR para la amplificación del *gen C*. Cada carril corresponde a una temperatura de la gradiente; λ /PstI, marcador de tamaño molecular.

La clonación de los productos amplificados solo se llevó a cabo en el cultivar Huachano. Se escogió este cultivar debido a que en él fueron encontradas las secuencias de *siRNAs* a partir de las cuales se diseñaron los iniciadores para las reacciones de PCR.

La Figura 10 muestra un análisis de restricción realizado a vectores plasmídicos pGem-T Easy (Promega) conteniendo el *gen C*, éstos fueron digeridos con la enzima *EcoRI* para comprobar la inserción del gen. Como se puede observar, los plásmidos 1, 3 y 4 contienen el gen de interés ya que presentan los 2 fragmentos esperados (uno de aprox. 3Kb correspondiente al plásmido solo y otro de 1347pb correspondiente al tamaño del *gen C*), únicamente el plásmido 2 no contiene el gen de interés.

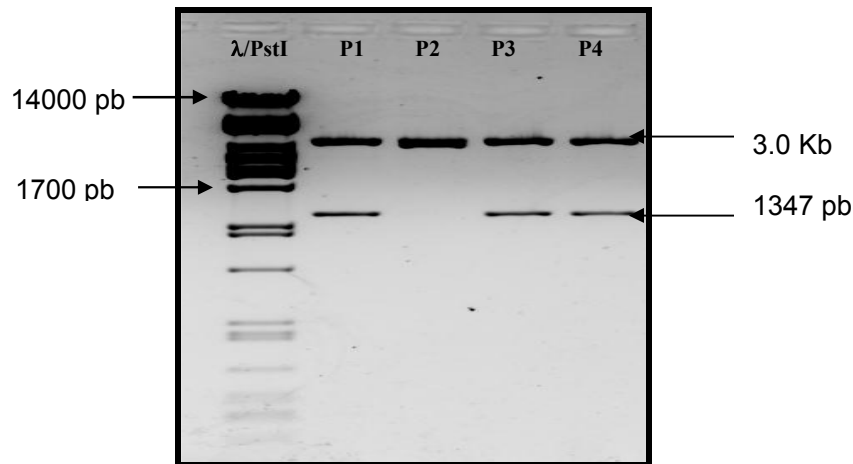


Figura 10.- Análisis de restricción con *EcoRI*. Los carriles P1, P2 P3 y P4, corresponden a los plásmidos 1, 2, 3 y 4; λ /PstI, marcador de tamaño molecular.

4.1.4 Análisis de las secuencias obtenidas

Las secuencias ensambladas se agruparon en 2 *contigs*, el primero comprendía a un tamaño de 792pb y estaba constituido por secuencias parciales del gen *Acs* mientras que el segundo poseía un tamaño de 4837pb y abarcaba las secuencias completas de los genes *C*, *iaaH*, *iaaM* y las regiones intergénicas *C-iaaH* e *iaaH-iaaM*. La Figura 11 muestra una vista estratégica del ensamblaje de este último *contig* obtenido con el programa Seqman, y en donde no se observan *gaps* ni regiones conflicto a lo largo de la secuencia.

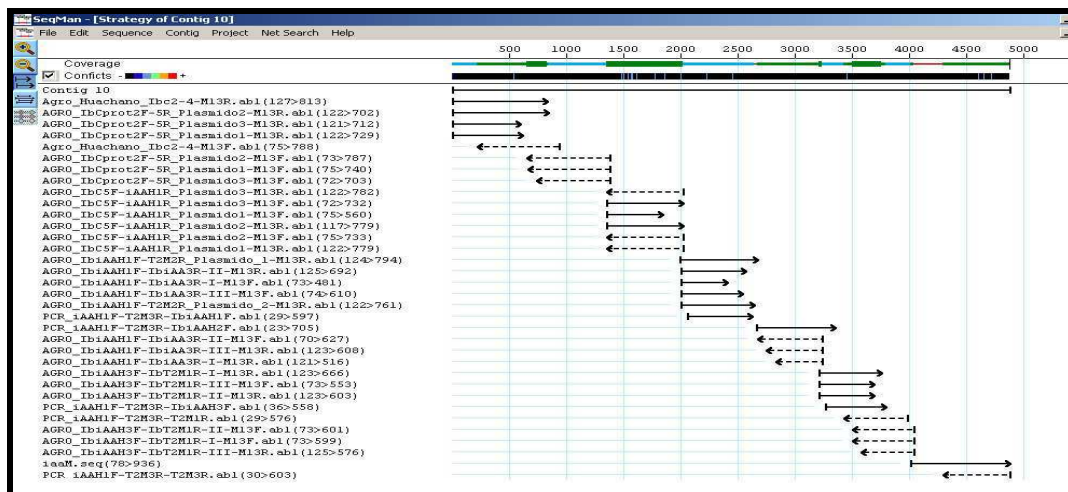


Figura 11.- Ensamblaje de secuencias correspondientes al T-DNA encontradas en el genoma de camote. *IbCprot*: iniciadores del gen *C*, *IbiAAH*: iniciadores del gen *iaaH*, *IbT2M*: iniciadores del gen *iaaM*.

Los resultados obtenidos hasta esta etapa permitieron identificar la longitud de los genes: *C*, *iaaH* e *iaaM*, las cuales correspondieron a 1620pb, 1413pb y 2200pb; y además, la presencia de un “*indel*” (inserción/delección) en la región correspondiente al gen *iaaM*, de 901pb (Figura 12), la cual fue identificada al compararla con secuencias homólogas a este gen de cepas de *Agrobacterium* spp. depositadas en la base de datos GenBank.

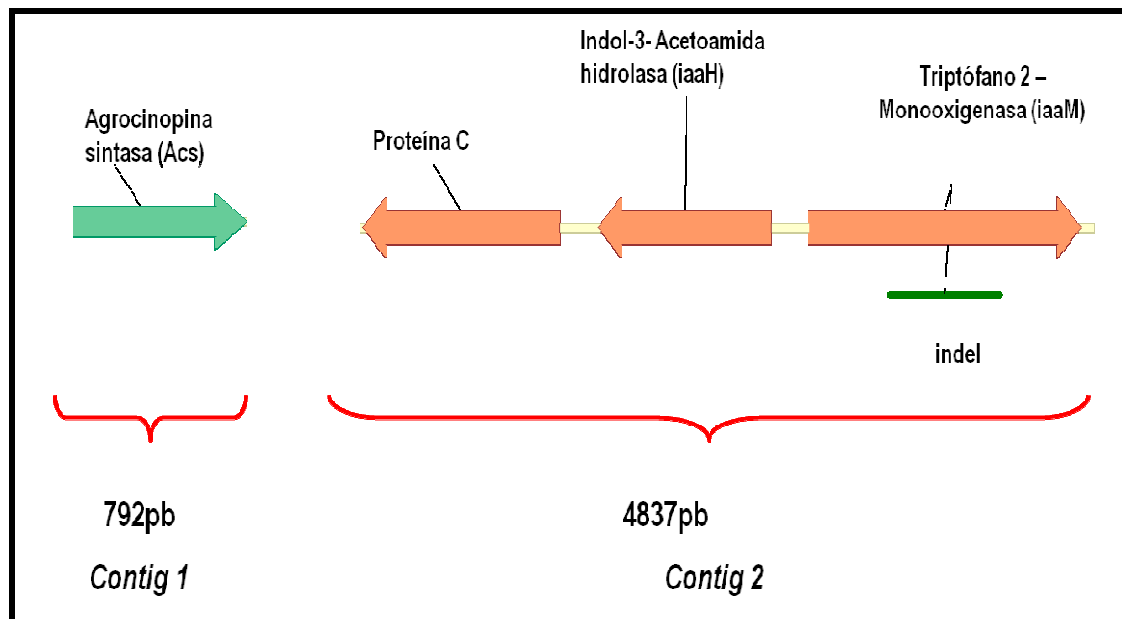


Figura 12.- Mapa génico del T-DNA de camote resultante de los análisis de PCR.

4.2 Amplificación y clonación de secuencias nucleotídicas “no conocidas” mediante *PCR- Genome Walker*.

4.2.1 Diseño de iniciadores

Los resultados obtenidos previamente proporcionaron la información necesaria para diseñar los iniciadores *PCR- Genome Walker*. Estos iniciadores se caracterizaron por poseer una longitud promedio de 26 a 30 nucleótidos, entre 40 y 60% de contenido de GC y poseer una *Tm* entre 60 y 70°C. La lista completa de los iniciadores se muestra en la Tabla 7.

4.2.2 Construcción de “*Bibliotecas Genome Walker*”

Se construyeron exitosamente 4 “*Bibliotecas Genome Walker*” correspondientes a las 4 enzimas de restricción empleadas: *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* y *StuI*. En la Figura 13 se puede verificar la digestión completa realizada con cada enzima de restricción previamente a la ligación con el adaptador.

Tabla 7.- Iniciadores diseñados para el desarrollo de la técnica de *Genome walker*

Iniciador	Secuencia	<i>T_m</i>
AGRO R1 4213	CTGGAAGGCTACAATTTGCGTAATTTGGCA	66.7
AGRO R2 3951	TACGCTGGGTTGGCAAGATACAAGACGACA	68.2
AGRO R3 3856	CCTGATCTGTCTCTCGACATTTCCAATCGAC	64.3
AGRO F1 18110	CATCCAAGCTGTTCTTGCTGACCGAGAGGA	69.2
AGRO F2 18090	AACACACACATGACGGGATCATCCAAGCTG	68.7
AGRO F3 18411	TCAACATGATTGGCTAACGGACAAGCATG	64.1
AGRO 18732 F2'	AGGAGTGCTGGAGAATGGCAATCCAATCG	68.9
AGRO 18715 F1'	GTAATCCATCATTGAGGAGGAGTGCTGGAG	64.7
AGRO 3221 R2'	CGAAGCGTCGGAGATTTATTCTTGCGATAC	66
AGRO 3623 R1'	ATCCGCTTCTTGCTTGCGTTCGTACTGATC	68.1
AGRO T2M 7285 F	GCGGAGGCTCTGTGTGATTTAGTCTCACGA	67.6
AGRO T2M 7147 F	ATCATTGAGGAGGAGTGCTGGAGAATGGC	66.8
AGRO T2M 7090 F	AGGCTGGGTCGAGGGAGCAATTCAAAC	67.5
AGRO Acs 121 R	TCGTCCATTGAAGAGATCCGCCAAGAGTT	67.1
AGRO Acs 245 R	TTCAAGAAACGGAATGCAATCAGGTGTACG	64.1
AGRO Acs 316 R	GCCTCATAGTTCCTTCCATCCAGAAAGACG	65.5

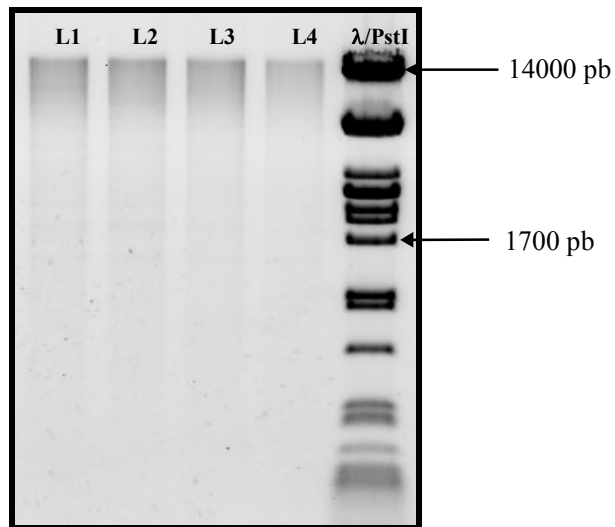


Figura 13.- Digestión enzimática de las *Bibliotecas Genome Walker*. L1, L2, L3 y L4, librerías *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* y *StuI*, respectivamente; λ /PstI, marcador de tamaño molecular.

4.2.3 *PCR Touchdown*

Se realizaron 6 reacciones de *PCR touchdown* con los iniciadores previamente descritos. Estos resultados nos permitieron obtener 10 secuencias nucleotídicas correspondientes a las 4 bibliotecas *DraI*, *EcoRV*, *StuI* y *PvuII*. Estas secuencias comprendieron a fragmentos desde 300 a 900pb, tal como se describe en la Tabla 8. La Figura 14 muestra el resultado del PCR primario para la *Biblioteca DraI* empleando los iniciadores AGRO F1 18110 y ADP1. Como se puede observar, se realizó una gradiente de temperaturas (64 a 74°C) y se escogió el amplificado con mayor número de bandas (carril 2 – 63.1°C) para la segunda amplificación.

Tabla 8.- Tamaño de los productos amplificados por *PCR Genome Walker*

Iniciadores	<i>Dra I</i> (pb)	<i>EcoR V</i> (pb)	<i>Stu I</i> (pb)	<i>Pvu II</i> (pb)
AGRO F1 18110 AGRO F3 18411	800pb	500pb	-	-
AGRO R1 4213 AGRO R2 3951	-	-	450pb	600pb
AGRO 18732 F2' AGRO 18715 F1'	-	-	300pb	600pb
AGRO 3221 R2' AGRO 3623 R1'	900pb	-	-	-
AGRO T2M 7090 F AGRO T2M 7285 F	-	-	-	900pb
AGRO Acs 121 R AGRO Acs 245 R	-	-	500pb	900pb

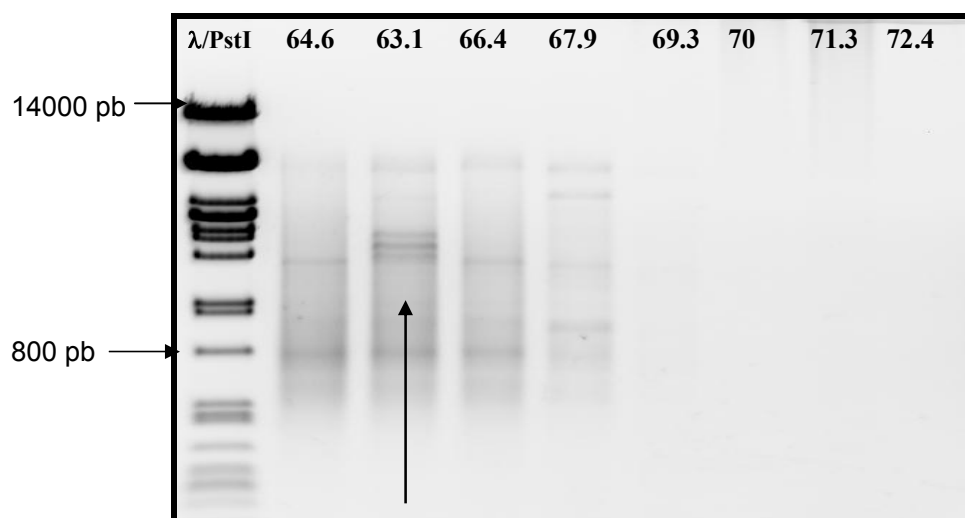


Figura 14.- PCR primario Librería *Dra I*. Cada carril corresponde a una temperatura de la gradiente (64.6- 72.4°C); λ/PstI, marcador de tamaño molecular.

La Figura 15 muestra el resultado del PCR secundario para la librería *Dra I* empleando los iniciadores AGRO F3 18411 y ADP2. Esta segunda amplificación es más sensible y específica que la primera ya que se puede observar un solo producto amplificado de 800pb constante a lo largo de la gradiente (63.4 a 70.7°C).

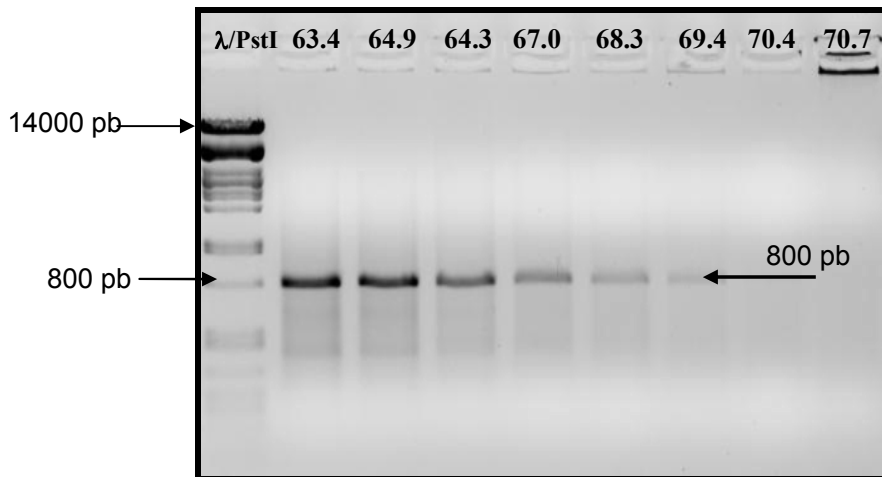


Figura 15.- PCR secundario Librería *Dra I*. Cada carril corresponde a una temperatura de la gradiente; λ /PstI, marcador de tamaño molecular.

Posteriormente, se ligaron y clonaron de manera exitosa los 10 fragmentos obtenidos en las reacciones de *PCR touchdown* previamente descritas. En la Figura 16 se muestra el resultado del análisis de restricción realizado a los vectores plasmídicos pGem-T Easy (Promega) conteniendo el producto del PCR secundario (*Librería EcoRV*) usando los iniciadores AGRO F3 18411 y ADP2. Los plásmidos P1, P2 y P3 contienen el inserto de interés ya que al ser digeridos con la enzima *EcoRI* se obtuvieron dos fragmentos esperados uno de aproximadamente de 3Kb correspondiente al vector, y otro de 500pb correspondiente al tamaño del inserto.

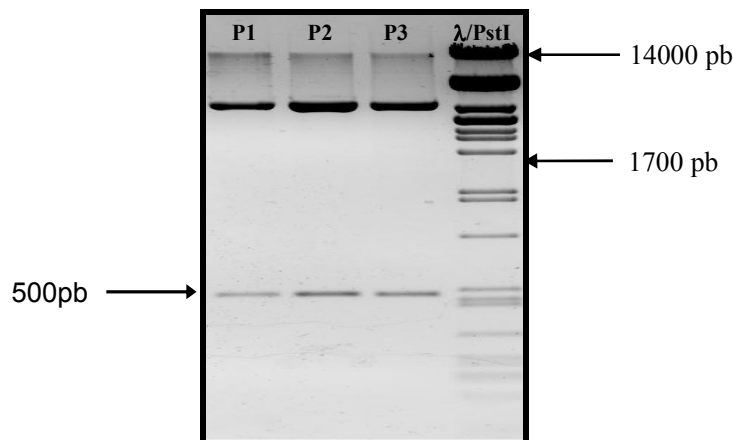


Figura 16.- Análisis de restricción con *EcoRI*. Los carriles P1, P2 y P3: corresponden a los plásmidos 1, 2 y 3; λ/PstI, marcador de tamaño molecular.

4.2.4 Análisis de las secuencias obtenidas.

Las secuencias nucleotídicas correspondientes a los 10 fragmentos resultantes de las reacciones de PCR *Genome Walker* fueron ensambladas junto con los 2 *contigs* descritos anteriormente. Los resultados obtenidos permitieron ensamblar en un solo *contig* todas las secuencias y además incrementar la longitud de sus extremos. El *contig* final obtenido comprendió un tamaño de 8123pb e incluyó las secuencias completas de los 4 genes de acuerdo al siguiente orden: *Acs*, *C*, *iaaH*, *iaaM* y a sus respectivas regiones intergénicas (Figura 17). A esta secuencia completa se le denominó *T-DNA de camote*.

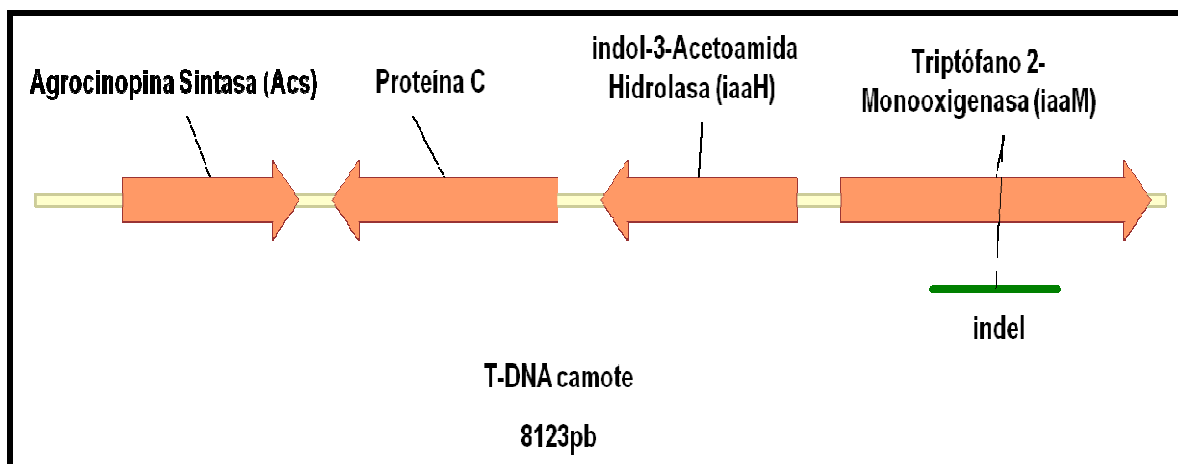


Figura 17.- Mapa génico del *T-DNA de camote* incluyendo las secuencias obtenidas por PCR *Genome Walker*.

4.3 Filogenia del *T-DNA* de camote

4.3.1 Secuencia nucleotídica completa:

La organización genómica completa es muy similar a:

- A) *Agrobacterium vitis* pTiTm4 TB-DNA, con la excepción de que el gen 5 está ausente en el *T-DNA* de camote y el gen Acs está en diferente orientación (Figura 18).
- B) *Agrobacterium tumefaciens* MAFF301001 pTi Sakura, con la excepción de que existe más de un gen adicional entre el gen C e *iaaH* y además el gen Acs está en diferente orientación (Figura 18).

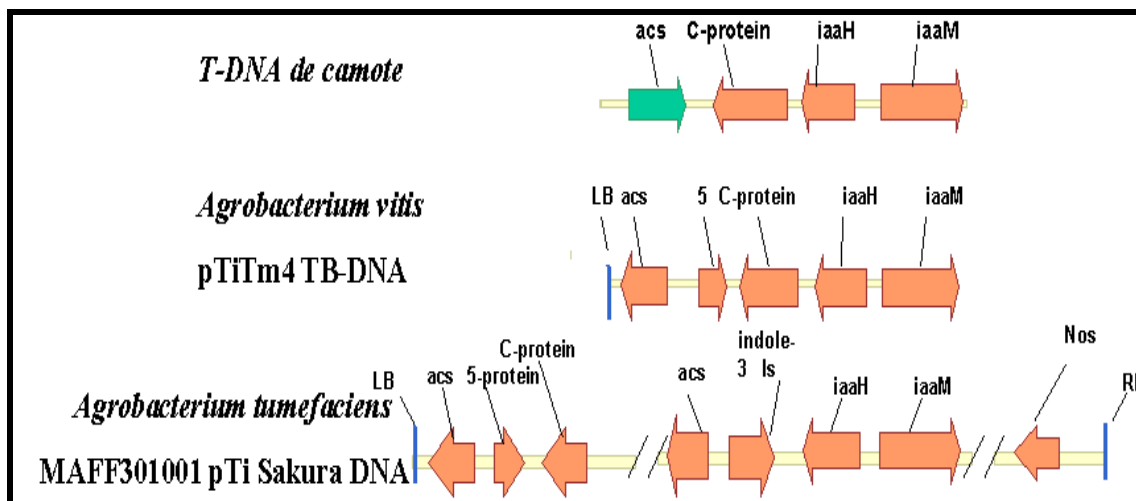


Figura 18.- Organización genómica del *T-DNA* de camote comparada con las de otras especies del género *Agrobacterium*.

Los resultados de la búsqueda BLASTn se resumen en la Tabla 9. Como se puede observar, los mejores *hits* (valores de identidad altos e E-value bajos) fueron tres secuencias de *Agrobacterium tumefaciens* (Números de acceso: AJ237588.1, AE007871.2 y AB016260.1) y una de *Agrobacterium vitis* (U83987.1), ello basado en los parámetros empleados (*query coverage* = 55% y *E-value* de al menos e-50) (Figura 19). El plásmido de la cepa *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58 fue la que presentó mayor porcentaje de cobertura de la secuencia (69%) mientras que *Agrobacterium vitis* plasmid pTiTm4 obtuvo el menor valor (55%). Ambas secuencias tuvieron porcentajes de máxima identidad

similares 70 y 72%, respectivamente. Los *E-value* obtenidos en todas las secuencias fueron significativos (<0).

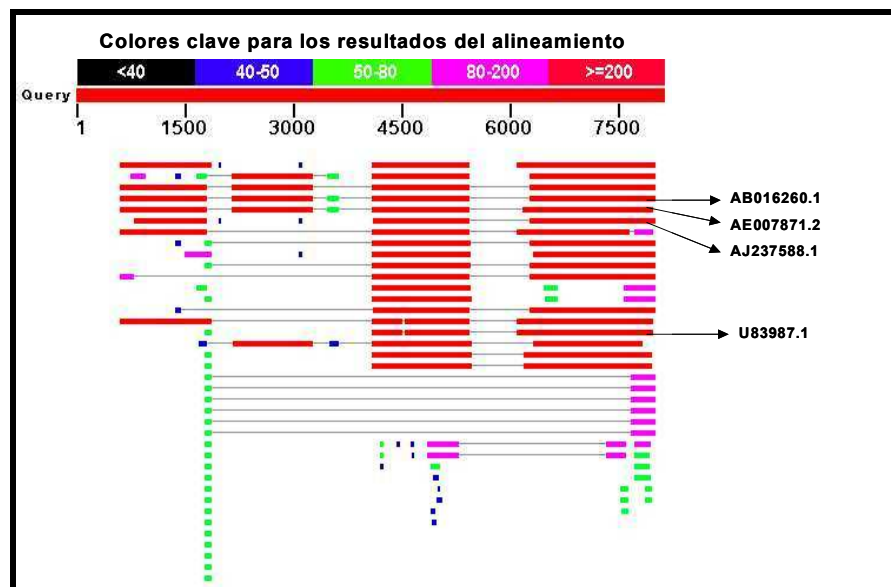


Figura 19.- Resultados del *BLASTn* de la secuencia completa del *T-DNA* de *camote*. Query: Secuencia problema a analizar; AJ237588.1, AE007871.2, AB016260.1 y U83987.1: número de accesiones de los mejores *hits* encontrados en la base de datos.

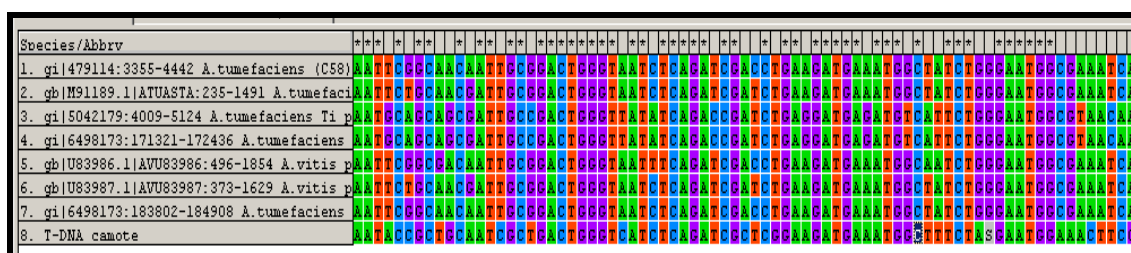
Tabla 9.-Resultados del *BLASTn* de la secuencia completa del *T-DNA* de *camote*.

Número de accesión	Descripción	Query ¹ coverage	<i>E</i> - ² value	Máx. ³ identidad
AJ237588.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ti plasmid pTiC58 T-DNA region	69%	5e-169	70%
AE007871.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 plasmid Ti	68%	5e-169	70%
AB016260.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> plasmid pTi-SAKURA DNA	66%	9e-172	70%
U83987.1	<i>Agrobacterium vitis</i> plasmid pTiTm4	55%	3e-146	72%

1: Porcentaje de la secuencia problema que ha conseguido encontrarse en la base de datos; 2: Es un valor estadístico que describe el número de alineamientos esperados al azar cuando se busca

4.3.2 Análisis filogenético de los genes individuales del T-DNA de camote

El alineamiento de las secuencias correspondientes al gen **Acs** se muestra en la figura 20, como se puede observar existen regiones conservadas en las secuencias analizadas.



La prueba de evaluación de saturación para este gen muestra que las transiciones alcanzan cierto nivel de saturación mas no las transversiones (Anexo N°4). De acuerdo a la opción Model Selection del programa MEGA 5.0, el modelo óptimo para la inferencia filogenética de estas secuencias (BIC: 8610.835) fue el de Kimura 2-parameter (K2+G) cuyo valor (+G) resultó en 0.71. El árbol filogenético NJ resultante (Figura 21), el cual incluyó a cepas de *A. tumefaciens* y *A. vitis* muestra que la secuencia del *T-DNA de camote* para este gen no se agrupa con ninguna de las secuencias analizadas; sin embargo éstas sí se agrupan entre sí en subclados fuertemente soportados, con valores de *bootstrap* mayores a 90%.

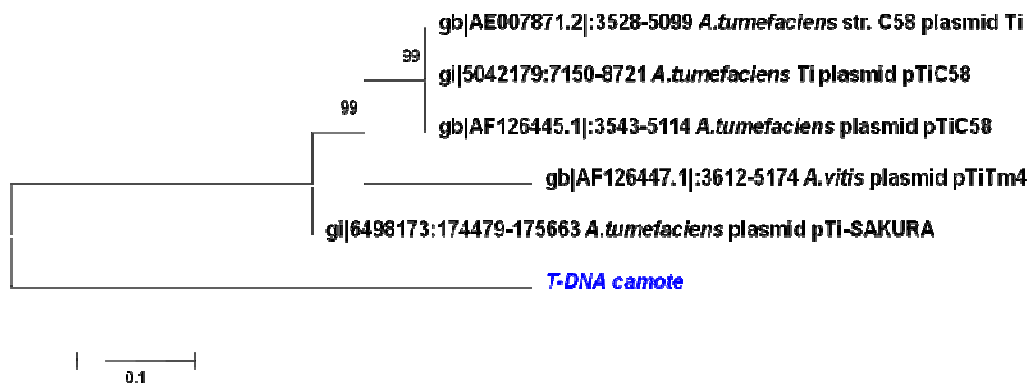


Figura 23.- Reconstrucción filogenética basada en el método NJ del gen C del *T- DNA de camote* y cepas de *Agrobacterium* relacionadas. Los valores de *bootstrap* calculado para 1000 replicaciones están indicados, mostrándose aquellos mayores al 50%. La escala representa la distancia genética.

El alineamiento de las secuencias correspondientes al gen *iaaH* se muestra en la figura 24, como se puede observar existen regiones conservadas en las secuencias analizadas y además eventos de recombinación.

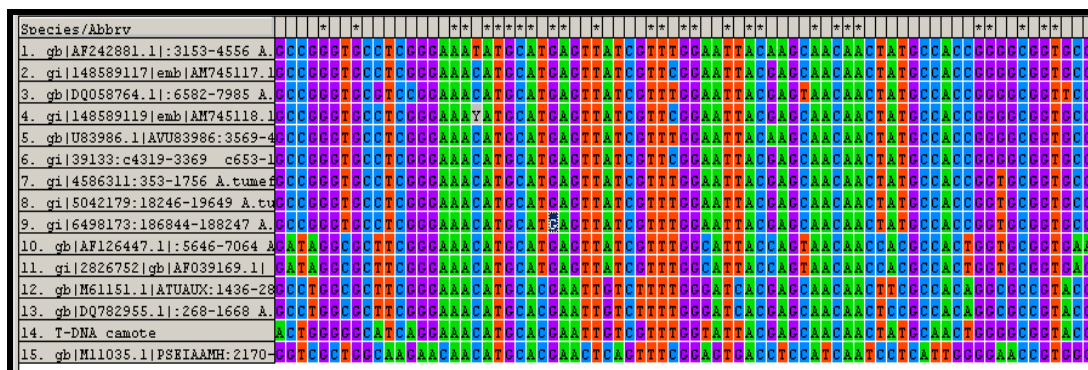


Figura 24.- Alineamiento múltiple de secuencias del gen *iaaH* del *T- DNA de camote* y cepas de *Agrobacterium* relacionadas. (*) indica las regiones consenso del alineamiento.

La prueba de evaluación de saturación para este gen muestra que las transiciones presentan cierto nivel de saturación mas no las transversiones (Anexo 4). El modelo óptimo (BIC:11946.458) fue el de Tamura 3-parameter (T92+G) cuyo valor (+G) resultó en 0.68. El árbol filogenético NJ resultante (Figura 25), el cual incluyó además de las secuencias de *A. tumefaciens*, *A. vitis* y

A. rizhogenes a una de *Pseudomonas syringae* como *out group* o grupo externo, muestra que la secuencia de este gen del *T-DNA* de camote se encuentra más cercanamente relacionada a las secuencias del género *Agrobacterium*, aunque al igual que en casos anteriores no se agrupa con ninguna de las mismas. La presencia de una secuencia *out group* para este gen nos permite distinguir cuatro grupos monofileticos dentro del género *Agrobacterium*, el primero que corresponde al *T-DNA* de camote, dos conformados exclusivamente por secuencias de *A. vitis* o *A. rhizogenes*, respectivamente, y un cuarto que agrupa a secuencias de *A. vitis* y *A. tumefaciens*.

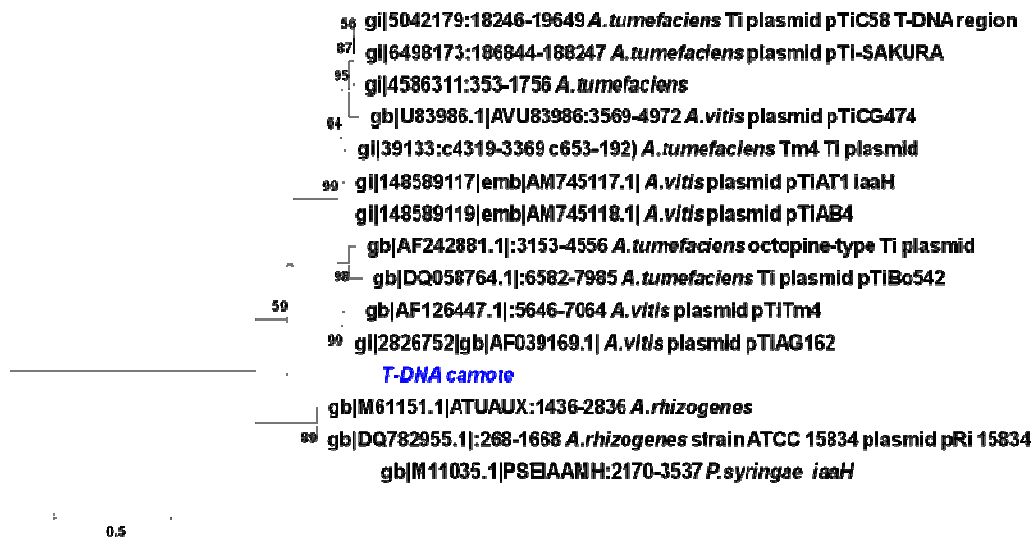


Figura 25.- Reconstrucción filogenética basada en el método NJ del gen *iaaH* del *T-DNA* de camote y cepas de *Agrobacterium* relacionadas. Los valores de *bootstrap* calculado para 1000 replicaciones están indicados, mostrándose aquellos mayores al 50%. La escala representa la distancia genética.

El alineamiento de las secuencias correspondientes al gen *iaaM* se muestra en la figura 26, como se puede observar existen regiones conservadas en las secuencias analizadas y además eventos de recombinación.

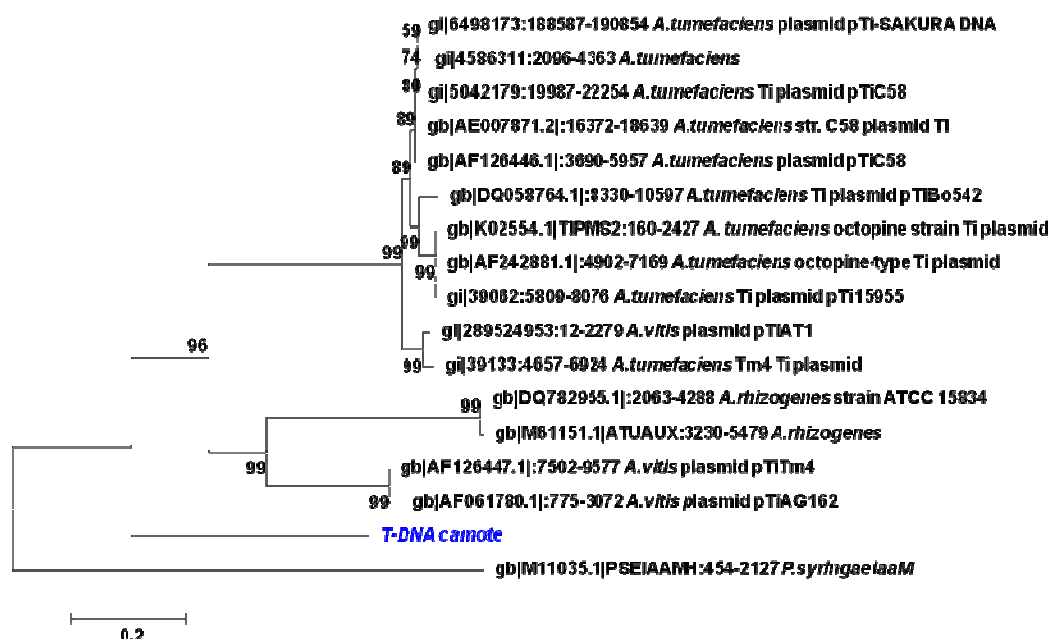


Figura 27.- Reconstrucción filogenética basada en el método NJ del gen *iaaM* del *T-DNA* de camote y cepas de *Agrobacterium* relacionadas. Los valores de *bootstrap* calculado para 1000 replicaciones están indicados, mostrándose aquellos mayores al 50%. La escala representa la distancia genética.

4.4 Hibridación por Southern blot

4.4.1 Extracción de DNA genómico.

El método utilizado, CTAB con algunas modificaciones (Manual de Protocolos CIP, 2006), resultó muy efectivo para la extracción de DNA genómico a mediana escala a partir de hojas de *Ipomoea batatas* (L.) Lam (6x) (2 cultivares) y (4x) (5 entradas), *Ipomoea trifida* (2x), *Ipomoea tabascana* (4x) y *Solanum tuberosum* cv Desireé (control negativo). La Figura 28 muestra los resultados de la calidad de DNA genómico luego de correr 1µL de resuspendido final de la extracción en un gel de agarosa al 1%. La concentración de DNA obtenido varió entre 300- 400ng/µL.

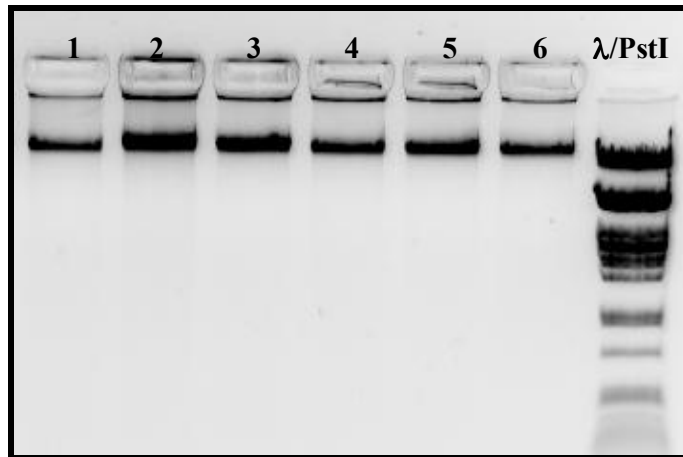


Figura 28.-Calidad del DNA genómico. Carril 1: *Ipomoea batatas* (L.) Lam cv Huachano, Carril 2: *Ipomoea batatas* (L.) cv Jewel, Carril 3: *Ipomoea batatas* (L.) Lam (4x), Carril 4: *Ipomoea trifida* (2x), Carril 5: *Ipomoea tabascana* (4x) y Carril 6: *Solanum tuberosum* cv. Desiré; λ /PstI: marcador de tamaño molecular.

4.4.2 Análisis de restricción

Los resultados del análisis de restricción identificaron a *EcoRI* como la enzima óptima para la digestión de las muestras, esto debido a que no es de corte frecuente en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (genera alrededor de 3000 sitios de corte en su genoma) y además posee el menor número de sitios de restricción en el T-DNA (sólo 2 sitios: Posiciones 4072 y 4579pb) (Figura 29). Asimismo, la digestión de las muestras analizadas fue verificada antes de iniciar el proceso de transferencia.

4.4.3 Diseño y marcaje de las sondas

La sonda fue diseñada en la región correspondiente al *gen C*, se ubicó en las posiciones 3112-3565pb, comprendió un tamaño de 775pb y fue obtenida con los iniciadores Ib Cprotein 3F- Ib Cprotein 4R. La Figura 29 muestra el mapa génico del análisis de restricción y la ubicación de la sonda “C 3F-4R”.

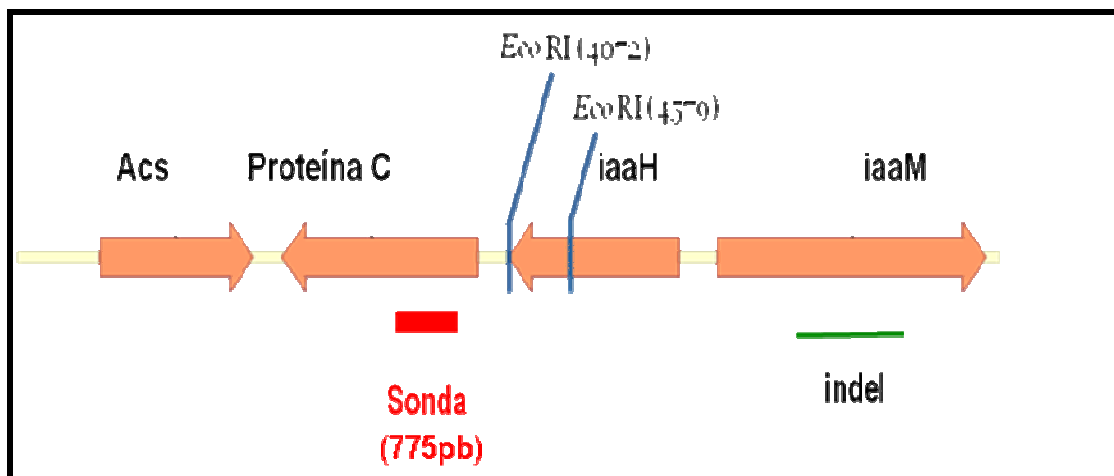


Figura 29.- Mapa génico del análisis de restricción y ubicación de la sonda diseñada.

La sonda **gen C 3F-4R** fue marcada con DIG mediante una reacción de PCR. En la Figura 30 se muestra la verificación del marcaje de la sonda, observándose que el producto de PCR marcado con DIG (carril 1) presenta un peso molecular superior en aprox. 100pb con respecto al producto de PCR sin marcar (carril 2), cuyo tamaño corresponde a 775pb.

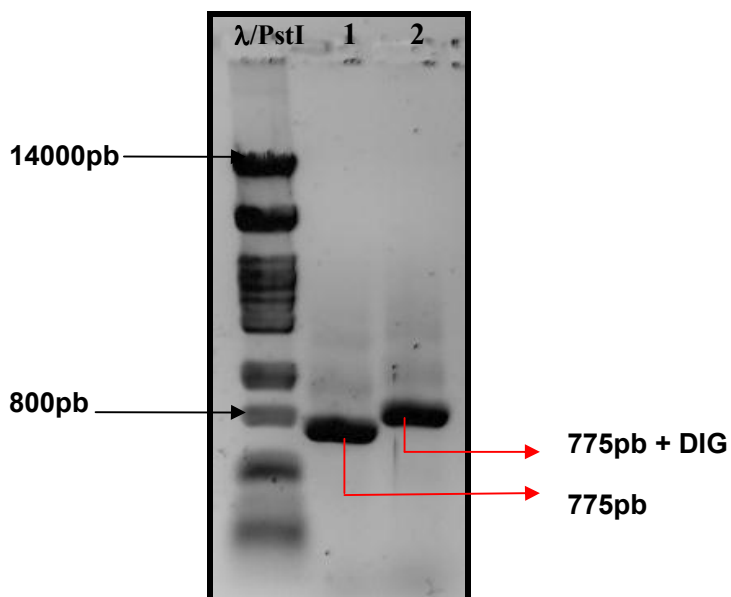


Figura 30.- Verificación de la sonda marcada. Carril 1: Producto de PCR de sonda **gen C 3F-4R** marcada con DIG, Carril 2: Control negativo sin marcar, **λ/PstI**: marcador de tamaño molecular.

4.4.4 Detección del *T-DNA de camote*

Los resultados obtenidos confirman la presencia de secuencias homólogas al T-DNA del plásmido Ti de *A. tumefaciens* “*T-DNA de camote*” en los genomas de *I. batatas* (L.) Lam (4x y 6x). La Figura 31 muestra el *film* resultante de la hibridación por *Southern blot* con la sonda *gen C 3F-4R* (775pb). El carril 1 corresponde *S. tuberosum*, mientras que los carriles 2 y 3 corresponden a las especies silvestres *I. trifida* (2x) e *I. tabascanana* (4x), respectivamente. Estas muestras no registran ningún patrón de bandas, indicando de esta manera la ausencia del *T-DNA de camote* en sus genomas. Los carriles 4 – 8, corresponden a las muestras de *I. batatas* (L.) Lam (4x) (1,2,3,4 y 5 respectivamente). De las cinco muestras analizadas se identificó una muestra positiva procedente de Colombia (CIP 403270), con un fragmento *EcoRI* de 12572pb, las cuatro muestras restantes resultaron negativas. Los carriles 9 y 10 corresponden a *I. batatas* (L.) Lam (6x) cv Jewel y Huachano, respectivamente. Ambas muestras resultaron positivas y presentan, según el número de fragmentos *EcoRI*, 4 copias del *T-DNA de camote* en sus genomas cuyos tamaños corresponden a 11501, 10430, 5791 y 5077pb.

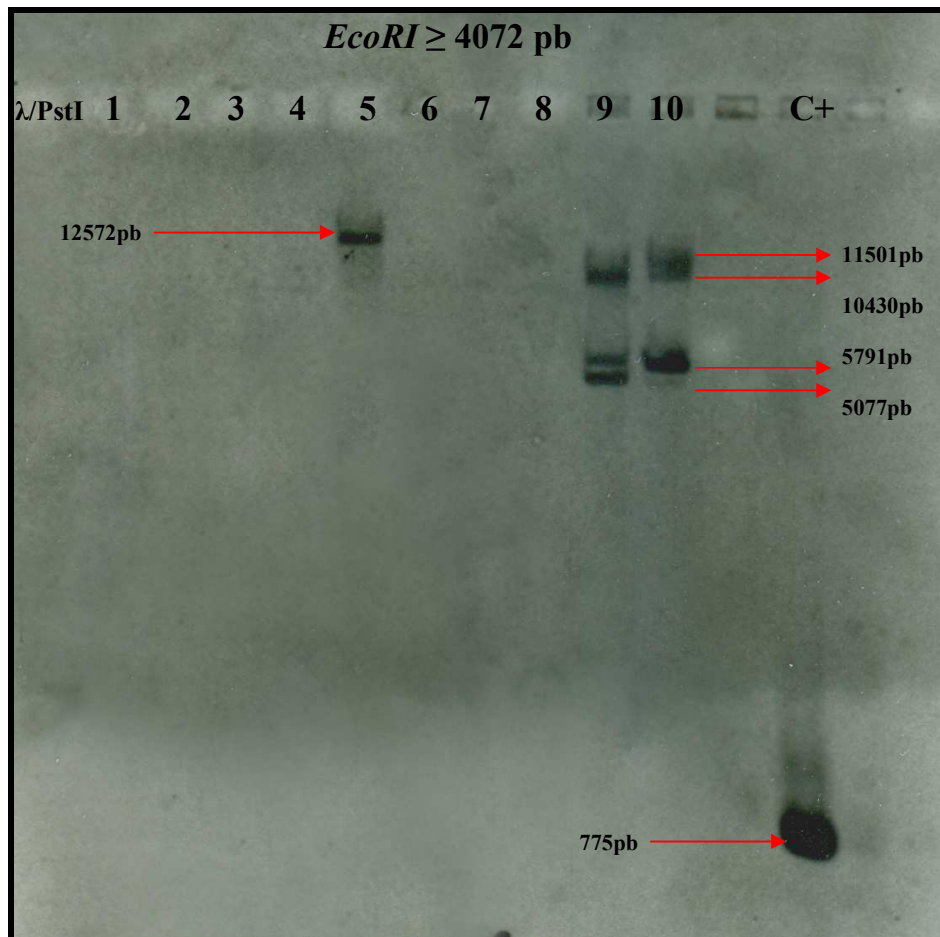


Figura 31.- Análisis de *Southern blot* de plantas de *Ipomoea batatas* (L.) Lam y especies silvestres cercanas digeridas con la enzima *Eco RI* e hibridadas con la sonda *gen C 3F-4R*. Carril 1: *S. tuberosum* cv. Desiré, Carril 2: *I. trifida* (2x), Carril 3: *I. tabascanana* (4x), Carril 4: *I. batatas* (L.) Lam (4x) –1, Carril 5: *I. batatas* (L.) Lam (4x) –2, Carril 6: *I. batatas* (L.) Lam (4x) – 3, Carril 7: *I. batatas* (L.) Lam (4x) – 4, Carril 8: *I. batatas* (L.) Lam (4x) – 5, Carril 9: *I. batatas* (L.) Lam cv Jewel, Carril 10: *I. batatas* (L.) Lam cv Huachano, C+: Producto de PCR de sonda sin marcar, λ/PstI: marcador de tamaño molecular. El tamaño del fragmento esperado debe ser mayor o igual a 4072 pares de bases.

V. DISCUSIÓN

5.1 Identificación y caracterización del *T-DNA de camote en Ipomoea batatas* (L.) Lam (6x).

El desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación masiva en paralelo no sólo ha cambiado el escenario para el análisis de la expresión génica de organismos, sino también ha contribuido a la identificación de nuevos patógenos como virus sin la necesidad de un conocimiento previo, esto fue demostrado en plantas por Kreuze *et al.*, 2009. En dicho trabajo, mediante secuenciación y ensamblaje de pequeños *RNAs* de interferencia (*small interference RNA*) “*siRNAs*”, no sólo se identificaron nuevos virus que infectan al camote sino que además se descubrieron secuencias homólogas al T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* siendo este hallazgo el punto de partida de la presente tesis. Basados en dichas secuencias se diseñaron iniciadores, utilizados en técnicas de *PCR* y *PCR-Genoma Walker*, que finalmente nos permitieron identificar y conocer la organización genómica y extensión de una región de 8123 pares de bases homóloga al T-DNA del plásmido Ti de especies del género *Agrobacterium* y que además, según ensayos de *Southern blot*, se encuentra insertada en el genoma de *Ipomoea batatas* (L.) Lam (6x) “camote”, en por lo menos 4 copias (11501, 10430, 5791 y 5077pb). A esta región la hemos denominado: “*T-DNA de camote*”. Mediante búsqueda de homologías en BLASTn se determinó que esta región incluye a los genes: *Acs*, *C*, *iaaH* e *iaaM* y sus respectivas regiones intergénicas. Este descubrimiento constituye la primera evidencia de transferencia horizontal de genes de origen bacteriano en el genoma de camote y además contribuye a la teoría de que la transferencia horizontal de genes actúa como una fuerza significativa en la evolución de genomas eucariotas (Bock, 2010; Richardson y Palmer, 2006; Talianova y Janousek, 2011).

El descubrimiento del *T-DNA de camote* coincide con los resultados obtenidos por White *et al.* (1983) quienes detectaron por primera vez secuencias homólogas al T-DNA del plásmido Ri de *A. rizhogenes* A4b en el genoma de una planta no transformada de *N. glauca*, a la cual denominaron *T-DNAc*; y Furner *et al.* (1986), quienes determinaron que las secuencias del *T-DNAc* en el genoma de

N. glauca estaban organizadas en la forma de una repetición invertida imperfecta de cerca de 13Kb de longitud, y además confirmaron la presencia de esta secuencia en otras especies del género *Nicotiana*. Asimismo, otros trabajos también han reportado la existencia de secuencias similares al *T-DNA* de *Agrobacterium* en otras especies vegetales fuera de este grupo taxonómico, tales como *Daucus carota* “zanahoria”, la cual contiene secuencias homólogas al *T-DNA* del pRi1855 (Spano *et al.*, 1982) y *Convolvus arvensis* cuyo genoma ha registrado secuencias homólogas al *T-DNA* de pRi8196 (Tepfer, 1984). Si bien la presencia de secuencias homólogas al *T-DNA* de *Agrobacterium* ha sido reportada en por lo menos cuatro genomas de plantas superiores (incluyendo camote) el origen eucariota o procariota de esta secuencia aún es desconocido. Sin embargo, existen dos posibles hipótesis, basadas principalmente en los estudios llevados a cabo en el género *Nicotiana*, que podrían explicar la ocurrencia de este evento. La primera fue propuesta por White *et al.* (1983) quienes sostienen que probablemente en la evolución de la interacción *Agrobacterium*-planta la bacteria haya capturado genes de la planta, los cuales se hayan reinsertado de nuevo dentro del genoma de la planta; y la segunda, propuesta por Furner *et al.* (1986), sostiene que en las primeras etapas de la evolución del género *Nicotiana* una infección de *Agrobacterium* a la planta resultó en la introducción del *T-DNA* dentro de su genoma.

Con el fin de determinar la presencia y distribución de esta secuencia dentro de la especie *Ipomoea batatas* (L.) Lam (6x), se evaluaron mediante pruebas de PCR 87 cultivares de camote procedentes de diferentes países de América, África, Oceanía y Asia, donde se cultiva esta raíz. Los resultados obtenidos fueron positivos para todas las muestras analizadas, lo cual evidencia que la presencia de esta región no corresponde a un fenómeno ocurrido al azar en un solo cultivar, sino que su distribución está generalizada en todos los camotes (6x). En vista de estos resultados, nosotros sugerimos que la transferencia de genes desde *Agrobacterium* al genoma de *Ipomoea batatas* (L.) Lam (6x) puede haber precedido a su especiación, tal como lo sugiere Furner *et al.* (1986) para el caso del *T-DNA* de *N. glauca*. Adicionalmente, estos resultados también han demostrado que la presencia de los genes del *T-DNA* de camote en todas las muestras analizadas no es homogénea, habiéndose reportado la

presencia de un *indel* (inserción/delección) de 901pb en la región correspondiente al gen *iaaM* en el cultivar Huachano, no siendo registrada en ninguno otro cultivar más. Este tipo de reordenamientos coincide con los registrados por Intriery y Buiatti (2001), en las secuencias del *T-DNA*c de especies del género *Nicotiana*; ellos identificaron eventos de duplicación y delección en los genes estudiados.

En vista de la alta incidencia de transferencia horizontal de genes hacia el genoma de plantas, algunos autores como Kejnovsky *et al.* (2009) han sugerido que la ocurrencia de este tipo de eventos en plantas superiores, específicamente en Angiospermas, se deba a que sus genomas son evolutivamente más dinámicos y lábiles que los de los mamíferos, por ejemplo. En ese sentido, características propias del desarrollo y estilo de vida de las angiospermas tales como la *plasticidad genética* así como la exposición de las líneas germinales a agentes externos hacen de estos organismos candidatos óptimos para la adquisición de genes horizontalmente.

Sin embargo, es importante destacar que dentro de este mismo grupo la adquisición de genes no ocurre de manera homogénea, es decir no todas las especies son susceptibles a adquirir genes por esta vía. Ejemplo de ello es la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, en la cual se ha analizado su genoma completo y no se ha detectado ningún evento de transferencia de genes. Algunos autores como Talianova y Janousek (2011) sugieren que esto se deba a la existencia de factores específicos de la especie (por ejemplo, diversas asociaciones con otras especies, tiempo de vida, vulnerabilidad a patógenos) que incrementen o disminuyan la probabilidad de ocurrencia de este tipo de eventos. En el caso del presente trabajo, el cultivo de camote presenta características agrícolas singulares que se podrían sugerir como factores que le permiten interactuar con diversos patógenos (virus, bacterias), y por ende incrementar la probabilidad de adquisición de genes foráneos. Estos factores incluyen a su ciclo de vida (semestral), su adaptabilidad a diversos pisos ecológicos (0-2500 m.s.n.m.), tolerancia a estres bióticos y abióticos, su propagación clonal por medio de esquejes (Bradshaw, 2010).

5.2 Identificación y caracterización del *T-DNA* de camote en especies silvestres cercanas a *Ipomoea batatas* (L.) Lam (6x).

El origen de la poliploidía así como la identidad del ancestro silvestre del camote hexaploide ($2n=6x=90$) todavía se encuentran en debate. Trabajos como los de Bohac *et al.* (1993) reportaron la existencia de camotes silvestres tetraploides ($2n = 4x = 60$) basado en el análisis de datos morfológicos y conteo de cromosomas. Si bien la existencia de estos camotes silvestres es aún controversial, nosotros decidimos incluirlos en este análisis debido a que podrían dilucidar algunas incógnitas acerca del linaje evolutivo de este cultivo. De manera similar, las especies silvestres *Ipomoea trifida* (2x) e *Ipomoea tabascanana* (4x) han sido señaladas como las más cercanas y probables progenitores de *I. batatas* (L.) Lam. (6x), ello basado tanto en el análisis de datos morfológicos (Austin 1977, 1987), marcadores moleculares (RFLP, RAPD, y SSR) (Jarret *et al.*, 1992; Jarret y Austin, 1994; Buteler *et al.*, 1999) y citogenética molecular (Srisuwan *et al.*, 2006), por lo que también fueron incluidas en este análisis.

Los resultados obtenidos por PCR evidenciaron la ausencia de secuencias homólogas al *T-DNA* de camote en las especies silvestres *I. trifida* (2x) e *I. tabascanana* (4x), así como en las entradas tetraploides, estos resultados fueron confirmados por *Southern blot* para casi todas las muestras excepto para *I. batatas* (L.) Lam. (4x) (CIP 403270) procedente de Colombia. Los perfiles de hibridación obtenidos evidenciaron la existencia de una sola copia (12572pb) del *T-DNA* de camote en *I. batatas* (L.) Lam (4x) lo cual difiere marcadamente del perfil obtenido en *I. batatas* (L.) Lam (6x) que posee por lo menos 4 copias (11501, 10430, 5791 y 5077pb). Esta variabilidad, tanto en número de copias como en el tamaño de los fragmentos *EcoRI* obtenidos, se le puede atribuir a la presencia de algún tipo de reordenamientos génicos tales como duplicaciones, inserciones y/o deleciones presentes en la secuencia analizada; aún así, estos hallazgos demuestran que ambos grupos de camotes (4x y 6x) comparten una secuencia génica común que no está presente en las otras dos especies silvestres señaladas como más cercanas (*I. trifida* e *I. tabascanana*) (Austin 1977, 1987; Jarret *et al.*, 1992; Jarret y Austin, 1994; Buteler *et al.*, 1999; Srisuwan *et al.*, 2006). Debido a la importancia de este hallazgo y a que aún la existencia de estos camotes silvestres es controversial, la identidad de las muestras incluidas en esta

tesis ha sido verificada por marcadores moleculares (AFLP's) y conteo de cromosomas (Comunicación personal Dra. Rossel, Curadora de camote CIP).

La detección del *T-DNA de camote* en *I. batatas* (L.) Lam. (4x) procedente de Colombia nos sugiere seguir investigando la presencia/ausencia de estos genes y su distribución en otros ejemplares de camotes tetraploides y otras especies silvestres relacionadas, especialmente los provenientes de América Central y del Sur ya que esta región es considerada centro de origen de esta especie (Austin, 1977; 1987), ello con el fin de ayudar a elucidar el linaje evolutivo de este género. Asimismo, estos estudios también podrían resolver algunas incógnitas acerca del origen de esta secuencia, tales como conocer si la infección inicial de *Agrobacterium* hacia el genoma de camote y/o sus parientes silvestres ocurrió en un solo evento o fue múltiple. En el caso de especies del género *Nicotiana* insertadas con *T-DNA*c de *A. rizhogenes*, la hipótesis predominante es la ocurrencia de ambos eventos (mono y múltiple) (Intrieri y Buiatti, 2001).

5.3 Filogenia del T-DNA de camote

El análisis de la organización genómica del *T-DNA de camote* revela que ésta es similar al TB-TDNA del plásmido Ti de *A. vitis* (cepa Tm4) y a los T-DNAs del plásmido Ti de *A. tumefaciens* (cepas MAFF301001 y C58), coincidiendo ello con los datos obtenidos mediante la búsqueda BLASTn, los cuales le confieren valores de similaridad del 72, 70 y 70%, respectivamente. Sin embargo, estos valores son considerados bajos ya que el porcentaje de cobertura de todas las secuencias analizadas fue menor al 70%. Esta baja similitud coincide con lo propuesto por Otten *et al.* (1992) y Tzfira y Citovsky (2008) quienes sugieren que la baja variabilidad presente en las secuencias de los plásmidos Ti (incluyendo la de los T-DNAs), se debe a que éstos están compuestos por secuencias homólogas y no homólogas, considerándose, por lo tanto, como un mosaico evolutivo. Por esta razón, y con el fin de realizar un análisis más detallado de la historia evolutiva de estos genes, nosotros decidimos realizar la reconstrucción filogenética de cada uno de los genes individuales: *Acs*, *C*, *iaaH* e *iaaM* (Figuras: 21, 23, 25 y 27). Los resultados obtenidos en estos análisis demostraron que si bien la secuencia del *T-DNA de camote* no forma clados fuertemente soportados

con los T-DNAs de los plásmidos Ti de *Agrobacterium spp.* (*A. tumefaciens* y *A. vitis*), ésta se encuentra filogenéticamente más cercana a dichas secuencias. Esto último se confirma en los análisis de los genes *iaaH* e *iaaM*, en las que se incluyó una secuencia *out group* (secuencias pertenecientes a *Pseudomonas syringae*) en la reconstrucción filogenética y de cuyos árboles se pudo inferir además que los genes *iaaH* e *iaaM* varían en su comportamiento evolutivo mostrándose más variable y más conservadas, respectivamente. Adicionalmente, las topologías de los árboles observados demuestran que muchos de los *clados* fuertemente soportados agrupaban tanto a cepas de *A. tumefaciens* como a las de *A. vitis*, lo cual evidencia la transferencia horizontal de genes del *T-DNA* entre los plásmidos Ti de estas especies bacterianas emparentadas, tal como lo reportan Tzfira y Citovsky (2008).

Los hallazgos obtenidos hasta esta etapa, basados en la organización genómica, búsqueda Blastn y análisis filogenético de los genes individuales, nos permiten inferir que las secuencias del *T-DNA de camote* se encuentran filogenéticamente más cercanas a las procedentes del T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium spp.* Sin embargo, debido a la gran variabilidad en cuanto a las estructuras de los T-DNAs y a la evidencia de que estas regiones se transfieren horizontalmente, no ha sido posible determinar el tipo plásmido Ti del cual proviene la secuencia de T-DNA encontrada en camote.

5.4 Posible rol del *T-DNA de camote* en el genoma de especies del género *Ipomoea*.

Las funciones de los genes del *T-DNA de camote* en el genoma de la planta de camote son aún desconocidas. Otten *et al.* (1999) identificaron las funciones del gen *C* a través de ensayos de mutación e infección en *Kalanchoe tubiflora*, determinando así que la función de este gen está relacionada con la inducción del desarrollo de meristemos. Asimismo, Klee *et al.* (1987) determinaron la función de los genes *iaaH* e *iaaM* mediante el desarrollo de plantas transgénicas de petunias, ellos demostraron que éstas presentaban un incremento en los niveles de auxinas en comparación con los controles de plantas no transformadas y además el desarrollo de anomalías (raíces adventicias, dominancia apical extrema y hojas enrolladas. Otros trabajos como los de Van Der Graaff *et al.* (2003) señalan

incluso que plantas transgénicas *iaaH/iaaM* que crecen bajo condiciones de cultivo por un tiempo prolongado muestran engrosamiento y crecimiento ectópico de raíces. Estos hallazgos sugieren la hipótesis de que la inserción del *T-DNA de camote* podría haber contribuido a la especiación dentro del género *Ipomoea* debido a que algunos síntomas de plantas transformadas con estos genes podrían conferir alguna ventaja adaptativa (por ejemplo, el engrosamiento de raíces). Sin embargo, esta hipótesis debería ser verificada con estudios de marcadores moleculares asociados a los genes del *T-DNA de camote*, marcadores morfológicos y análisis de la expresión de estos genes en diferentes tejidos y estadios de desarrollo de la planta.

VI. CONCLUSIONES

1. Se identificó una región de 8123pb homóloga al T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium* spp. , la cual incluye a los genes: *Acs*, *C*, *iaaH* e *iaaM* y sus respectivas regiones intergénicas, insertada en el genoma de *Ipomoea batatas* (L.) Lam (6x) cv Huachano a la cual se ha denominado “*T-DNA de camote*”.
2. Se confirmó la presencia del *T-DNA de camote* en 86 cultivares de *Ipomoea batatas* (L.) Lam (6x) adicionales, provenientes de diferentes países donde crece este cultivo.
3. Se identificó la presencia del *T-DNA de camote* en una entrada (4x) de *Ipomoea batatas* (L.) Lam (CIP 403270) y la ausencia de la misma en las especies silvestres *Ipomoea trifida* (2x) e *Ipomoea tabascana* (4x).
4. La secuencia del *T-DNA de camote* está presente en al menos 4 copias dentro del genoma de *Ipomoea batatas* (L.) Lam (6x) cv Huachano y en al menos 1 copia en la entrada (4x) de *Ipomoea batatas* (L.) Lam (CIP 403270).

VII. RECOMENDACIONES

1. Identificar otros genes del T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium spp.* insertadas en el genoma de camote mediante la técnica de *PCR-Genome Walker*.
2. Evaluar la presencia del *T-DNA de camote* en otras entradas (4x) de *Ipomoea batatas* (L.) Lam y especies silvestres relacionadas con énfasis en las procedentes de América del Sur y Central.
3. Evaluar la expresión de los genes identificados del *T-DNA de camote* en diferentes tejidos y tiempo de desarrollo de la planta.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akiyoshi, D.E.; Klee, H.; Amasino, R.M.; Nester, E.W.; Gordon, M.P. 1984. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 5994–5998.
2. Austin, D.F. 1977. Hybrid polyploids in *Ipomoea* section *Batatas*. *J. Hered.* 68:259-260.
3. Austin, D.F. 1988. The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweet potatoes and related wild species. In: Exploration, maintenance and utilization of sweetpotato genetic resources. Report of the First Sweet Potato Planning Conference 1987. International Potato Center, Lima, Peru. Pp. 27-59.
4. Ballas, N.; Citovsky, V. 1997. Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:10723-28.
5. Barrau L'Enigme de la patate douce en Oceanie. Etudes d'Outre-Mer. 40: 83-87. 1957. [citado por Yen, D.E. (1974). The Sweet Potato and Oceania, An Essay in Ethnobotany. Bishop Museum Press, Honolulu, Hawaii.]
6. Barry, G. F.; Rogers, S.G., Fraley, R.T.; Brand L. 1984. Identification of a cloned cytokinin biosynthesis gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81: 477-680.
7. Bock, R. 2010. The give-and-take of DNA: horizontal gene transfer in plants. *Trends in Plant Science* 15 (1): 11-22.
8. Bohac J.; Austin D.; Jones A. 1993. Discovery of wild tetraploid sweetpotatoes. *Economic Botany* 47(2):193-201.
9. Bradshaw, J.E. 2010. Root and Tuber Crops. *Springer*. Pp. 95-97.
10. Broothaerts, W.; Mitchell H.; Weir B.; Saines S.; Smith L.; Yang W.; Mayer J.; Roa-Rodríguez C.; Jefferson R. 2005. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* 433:629-633.
11. Buteler, M.I.; Jarret, R.L.; La Bonte D.R. 1999. Sequence characterization of microsatellites in diploid and polyploid *Ipomoea*. *Theoretical and Applied Genetics* 99:123-132.
12. Carey, E.; Chujoy, E.; Dayal, T.; Kidanemariam, H.; Mendoza H.; Mok II-Gin. 1992. Helping meet varietal needs of the developing world: The International

- Potato Center's strategic approach to sweetpotato breeding. En Sweetpotato for the 21st Century Technology. Alabama, USA. Pp. 521-532.
13. Centro Internacional de la Papa (CIP). 1996. Sweet potato facts. A compendium of key figures and analysis for 33 important sweet potato – producing countries.
 14. Chawla, R.; De Mason, D. 2003. Genome Walking in pea: an approach to clone unknown flanking sequences. *Pisum Genet.* 35:3-5.
 15. Chilton, M. D.; Drummond, M. H.; Merio, D. J.; Sciaky, D.; Montoya, A. L.; Gordon, M. P.; Nester, E. W. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11: 263-267.
 16. Chilton, M. D.; Saiki, R. K. Yadav, N.; Gordon, M.P.; Quetier, F. 1980. T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumour cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4060-4064.
 17. Costantino, P.; Hooykaas, P.J.; Den Dulk-Ras, H.; Schilperoort, A. 1980. Tumor formation and rhizogenicity of *Agrobacterium rhizogenes* carrying Ti plasmids. *Gene*. 11:79-87.
 18. Costantino, P.; Capone I.; Cardarelli, M.; De Paolis, A.; Mauro, M.L.; Trovato M. 1994. Bacterial plant oncogenes: the rol genes' saga. *Genetica*; 94(2-3): 203-11.
 19. McDonald, A.; Austin, A. 1990. 42(2):116-120.
 20. Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press.
 21. Cronquist, A. 1988. The Evolution y Classification of Flowering Plants. Second edition. The New York Botanical Garden, New York.
 22. Currier, T.C; Nester, E.W. 1976. Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Anal Biochem.* 76:431-441.
 23. Deng, W.; Chen, L.; Wood, D.W.; Metcalfe, T.; Liang X.; Gordon, M.P.; Comai, L.; Nester, E.W. 1998. *Agrobacterium* VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:7040-45.

24. Denker, E.; Baptiste, E.; Le Guyader, H.; Manuel M.; Rabet N. 2008. Horizontal gene transfer and the evolution of cnidarian stinging cells. *Current Biology* Vol 18(18): 1-2.
25. Depicker, A.; Schell, J.; Van Montagu, M. 1977. Comparative study of Ti-plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* by use of restriction enzymes. *Biochem Soc Trans.* 5:931-2.
26. Dessaux, Y.; Petit, A.; Tempe, J.; Demarez, M.; Legrain, C.; Wiame, J. M. 1986. Arginine catabolism in *Agrobacterium* strains: role of the Ti plasmid. *J Bacteriol.* 166: 44-50.
27. Ellis, J.G.; Ryder, M.H; Tate, M. E. 1984. *Agrobacterium tumefaciens* TR-DNA encodes a pathway for agropine biosynthesis. *Mol Gen Genet* 195: 466-473.
28. Engler, G.; Depicker, A.; Maenhaut, R.; Villarroel, R.; Van Montagu, M., Schell, J. 1981. Physical mapping of DNA base sequence homologies between an octopine and nopaline Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Mol Biol.* 152: 183-208.
29. Escobar, M.; Dandekar, A. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science* 8 (8): 380-386.
30. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2006. <http://www.fao.org>
31. FAOSTAT. FAO Statistical Database [En línea]. 2009. <http://faostat.fao.org>
32. Friesner, J.; Britt A.B. 2003. Ku80- and DNA ligase IV-deficient plants are sensitive to ionizing radiation and defective in T-DNA integration. *Plant J.* 34(4): 427-40.
33. Furner, I.; Huffman, G.; Amasino, R.; Garfinkel D.; Gordon M.; Nester E. 1986. An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. *Nature* 319: 422-427.
34. Gaffney T.D.; da Costa e Silva O.; Yamada T.; Kosuge T. 1990. Indoleacetic acid operon of *Pseudomonas syringae* subsp. savastanoi: transcription analysis and promoter identification. *J Bacteriol.* 172(10):5593-601.
35. Ghai, J.; Das, A. 1989. The virD operon of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid encodes a DNA-relaxing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3109-3113.

36. Gelvin, S. B. 2000. Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51:223-56.
37. Gelvin, S. B. 2003. Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool *Microbiology And Molecular Biology Reviews* Pp. 16–37.
38. Gelvin, S. B. 2009. Agrobacterium in the Genomics Age. *Plant Physiology* 150: 1665–1676.
39. Gheysen, G.; Villaroel, R.; Van Montagu, M. 1991. Illegitimate recombination in plants: a model for TDNA integration. *Genes Dev.* 5: 287-97.
40. Gladyshev, E. A.; Meselson, M.; Arkhipova, I.R. 2008. Massive Horizontal Gene Transfer in Bdelloid Rotifers. *Science* 320:1210-1213
41. Gogarten, J.P.; Doolittle W.F.; Lawrence J.G. 2002. Prokaryotic Evolution in Light of Gene Transfer. *Mol. Biol. Evol.* 19(12): 2226–2238.
42. Gupta, R.S. 2000. The natural evolutionary relationships among prokaryotes. *Critical Reviews in Microbiology* 26:111-131.
43. Guralnick, B.; Thomsen, G.; Citovsky, V. 1996. Transport of DNA into the nuclei of Xenopus oocytes by a modified VirE2 protein of Agrobacterium. *Plant cell* 8: 363-373.
44. Herman, L.; Jacobs, A.; Van Montagu, M.; Depicker, A. 1990. Plant chromosome / marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration events. *Mol Gen Genet.* 224:248-56.
45. Huang, J.C.; Sun, M. 2000. Genetic diversity and relationship of sweet potato and its wild relatives in Ipomoea series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA, *Theor. Appl. Genet.* 100: 1050–1060.
46. Hotopp, J.C.; Clark M.E.; Oliveira, D.; Foster, J.M.; Fischer, P.; Muñoz, M. C.; Giebel, J.D.; Kumar N.; Ishmael, N.; Wang, S.; Ingram J.; Nene, R.V.; Shepard, J.; Tomkins, J.; Richards, S.; Spiro, D.J.; Ghedin, E.; Slatko, B.E.; Tettelin, H.; Werren, J. H. 2007. Widespread Lateral Gene Transfer from Intracellular Bacteria to Multicellular Eukaryotes. *Science.* 317:1753 – 1756.
47. Huamán, Z. 1992. Systematic botany and morphology of the Sweetpotato plant. Technical Information Bulletin 25. International Potato Center, Lima-Perú. Pp. 2-6.

48. Holsters, M.; Silva, B.; Van Vliet, F.; Genetello, C.; De Block, M.; Dhaese, P.; Depicker, A.; Inzé, D.; Engler, G.; Villarroel, R.; Van Montagu, M.; Schell, J. 1980. The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTi C58. *Plasmid* 3: 212-230.
49. Hooykaas, P. J.; Klapwijk, P. M.; Nuti, M. P.; Schilperoort, R. A.; Rorsch, A. 1977. Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent *Agrobacteria* and to *Rhizobium ex planta*. *J. Gen. Microbiol.* 98: 477-484.
50. Hooykaas, P. J.; den Dulk-Ras, H.; Ooms, G.; Schilperoort, R. A. 1980. Interactions between octopine and nopaline plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 143:1295-1306.
51. Hooykaas, P. J.; Den dulkRas, H.; Schilperoort, R. A. 1988. The *Agrobacterium tumefaciens* T DNA gene 6b is an onc gene. *Plant Molecular Biology* 11: 791.
52. Intrieri, M. C.; Buiatti, M. 2001. The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana*. *Mol. Phylogenet. Evolu.*, 20: 100-110.
53. Inzé, D.; Follin, A.; Van Lijsebettens, M.; Simoens, C.; Genetello, C.; Van Montagu, M.; Schell, J. 1984. Genetic analysis of the individual T-DNA gene of *Agrobacterium tumefaciens*: further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 194:265-274.
54. Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) 2006. <http://www.inia.gob.pe/>
55. Jarret, R. L.; Gawel, N.; Whittemore, A. 1992. Phylogenetic relationships of the sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 117(4):633-637.
56. Jarret R. L.; Austin D. F. 1994. Genetic diversity and systematic relationships in sweetpotatoes [(*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)] and related species as revealed by RAPD analyses. *Genet. Res. Crop Evol.* 41:165-173.
57. Jin, S.; Roitsch, T.; Ankenbauer, R. G.; Gordon, M. P.; Nester, E. W. 1990. The VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* is autophosphorylated and is essential for vir gene regulation. *J. Bacteriol.* 172: 525-530.
58. Joos, H.; Inzé, D.; Caplan, A.; Sormann, M.; Van Montagu, M.; Schell, J. 1983. Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown galls. *Cell* 32: 1057-1067.

59. Kado, C. I. 1994. Promiscuous DNA transfer system of *Agrobacterium tumefaciens*: role of the virB operon in sex pilus assembly and synthesis. *Mol Microbiol.* 12:17-22.
60. Karyeija, R.; Gibson, R.; Valkonen, J. 1998. The significance of sweet potato feathery mottle virus in subsistence sweetpotato production in Africa. *Plant Dis.* 82:4-15.
61. Kejnovsky, E.; Leitch, I.J.; Leitch A.R. 2009. Contrasting evolutionary dynamics between angiosperm and mammalian genomes. *Trends in Ecology and Evolution* 24 (10):572-582.
62. Klee H. J.; Horsch R. B.; Hinchee M. A.; Hein M. B.; Hoffmann N. L. 1987. The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. *Genes Dev.* 1: 86-96.
63. Korber, H.; Strizhov, N.; Staiger, D.; Feldwisch, J.; Olsson, O.; Sandberg, G.; Palme, K.; Schell, J.; Koncz, C. 1991. T-DNA gene 5 of *Agrobacterium* modulates auxin response by autoregulated synthesis of a growth hormone antagonist in plants. *EMBO J* 10: 3983–3991.
64. Kreuze, J.F.; Perez, A.; Untiveros, M.; Quispe, D.; Fuentes, S.; Barker, I.; Simon, R. 2009. Complete Viral genome sequence and discovery of novel Viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of Viruses. *Virology* 388: 1–7.
65. Lambert, C.; Tepfer, D. 1992. Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones. *Theor. Appl. Genet.* 85: 105–109
66. Leemans, J.; Deblaere, R.; Willmitzer, L.; DeGreve, H.; Hernalsteens, J. P.; Van Montagu, M.; Schell, J. 1982. Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls. *EMBO J.* 1: 147-152.
67. Lessl, M.; Lanka, E. 1994. Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells. *Cell* 77: 321-24.
68. Li, R.; Salih, S.; Hurtt, S. 2004. Detection of Geminiviruses in Sweetpotato by Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease* 88 (12): 1347-51.
69. Llop, P. 2003. Tesis: Caracterización molecular de la pérdida del poder patógeno en *Agrobacterium tumefaciens* Universitat De Valencia Servei De Publicacions.

70. Maiden, M.C. 1998. Horizontal Genetic Exchange, Evolution, and Spread of Antibiotic Resistance in Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*. 27(Suppl 1): S12–20.
71. Matthysse, A.G. 1983. Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. *J Bacteriol.* May; 154(2): 906–915.
72. Matthysse, A.G.; Holmes, K.V; Gurlitz, R.H. 1981. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J Bacteriol.* Jan; 145(1): 583–595.
73. Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. 1999. Brock Biología de los Microorganismos. 8va. Edición. Editorial Prentice Hall Iberia, Madrid. 734-736.
74. Mayerhofer, R.Z.; Koncz-Kalman, C.; Nawrath, G.; Bakkeren, A.; Cramer A.; Angelis K.; Redei G.P.; Schell J.; Hohn B.; Koncz, C. 1991. T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO J.* 10:697-704.
75. Messens, E.; Lenaerts, A.; Van Montagu, M.; Hedges, R.W. 1985. Genetic basis for opine secretion from crown gall tumor cells. *Mol Gene Genet.* 199-344.
76. Meyer, A.D.; Ichikawa, T.; Meins, F. Jr. 1995. Horizontal gene transfer: regulated expression of a tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes* *rol C* gene. *Mol Gen Genet.* 249(3): 265-73.
77. Nam, J.; Matthysse, A.G.; Gelvin, S.B. 1997. Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. *Plant Cell* 9: 317-33.
78. Nikoh, N.; Tanaka, K.; Shibata, F.; Kondo, N.; Hizume, M.; Shimada, M.; Fukatsu, T. 2008. Wolbachia genome integrated in an insect chromosome: Evolution and fate of laterally transferred endosymbiont genes. *Genome Res.* 18: 272-280.
79. Ochman, H.; Lawrence, J.G.; Groisman, E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. 2000. *Nature* 405: 299-304.
80. Otten, L.; Canaday, J.; Gérard J.C.; Fournier, P.; Crouzet P.; Paulus F. 1992. *Molecular Plant Microbe Interactions* 5(4): 279-287.
81. Peralta, E. G.; Ream, L. W. 1985. T-DNA border sequences required for crown gall tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:5112-6.
82. Perry, L. 2002. Starch granule size and the domestication of manioc (*Manihoc esculenta*) and Sweetpotato (*Ipomoea batatas*). *Economic Botany* 56:345-349.

83. Rajapakse S.; Nilmalgoda, D.S.; Molnar, M.; Ballard E.R.; Austin F.D.; Bohac R.J. 2004. Phylogenetic relationships of the sweet potato in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) based on α -amylase gene sequences, *Mol. Phylogenet. Evol.* 30: 623–632.
84. Rajendran, P. 1990. Breeding methods in sweet potato. Second international training course on sweet potato production, India. Pp: 4-13.
85. Relic, B.; Andjelkovic, M.; Rossi, L.; Nagamine, Y.; Hohn B. 1998. Interaction of the DNA modifying proteins VirD1 and VirD2 of *Agrobacterium tumefaciens*: analysis by subcellular localization in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:9105-10.
86. Richardson, A.O.; Palmer, J.D. 2007. Horizontal gene transfer in plants. *J. Exp. Bot.* 58:1–9.
87. Rossel, G.; Kriegner, A.; Zhang, D.P. 2000. From Latin America to Oceania: The Historic Dispersal of Sweetpotato Re-examined Using AFLP. CIP Program Report 1999 – 2000. Pp. 315-321.
88. Schroder, G., Waffenschmidt, S.; Weiler E.W.; Schroder, J. 1984. The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. *Eur J Biochem* 138: 387–391.
89. Shaw, C.H.; Watson, M.D.; Carter, G.H.; Shaw, C.H. 1984. The right hand copy of the nopaline Ti plasmid 25 pb repeat is required for tumor formation. *Nucleic Acids Res* 12:6031-6041.
90. Shen, W.H.; Petit, A.; Guern, J.; Tempe, J. 1988. Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 3417–3421.
91. Sheng, J.; Citovsky, V. 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *Plant cell.* 8:1699-1710.
92. Siebert, P. D.; Chenchik, A.; Kellogg, D. E.; Lukyanov, K. A.; Lukyanov, S. A. 1995. An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 23:1087–1088.
93. Spanier, K.; Schell J.; Schreier, P.H. 1989. A functional analysis of T-DNA gene 6b: the fine tuning of cytokinin effects on shoot development. *Mol Gen Genet* 219: 209–216.
94. Spano, L.; Pomponi, M.; Costantino, P.; Van Slogteren, G.; Tempé, J. 1982. Identification of T-DNA in the root-inducing plasmid of the agropine type *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plant Mol Biol* 1:291–300.

95. Spielmann, A.; Simpson, R. B. 1986. T-DNA structure in transgenic tobacco plants with multiple independent integration sites. *Mol Gene Genet* 205: 34-41.
96. Srisuwan, S.; Sihachakr, D.; Siljak-Yakovlev S. 2006. The origin and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches. *Plant Science* 171: 424–33.
97. Stachel, S. E.; Timmerman, B.; Zambryski, P. 1986. Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Nature* 322: 706-12.
98. Suzuki, K.; Yamashita, I.; Tanaka, N. 2002. Tobacco plants were transformed by *Agrobacterium rhizogenes* infection during their evolution. *Plant J.* 32(5): 775-87.
99. Swart, S.; Lugtenberg, B. J. J.; Smit, G.; Kijne, J. W. 1994. Rhicadhesin-mediated attachment and virulence of an *A. tumefaciens* chvB mutant can be restored by growth in a highly osmotic medium. *J Bacteriol* 176:3816-19.
100. Talianova, T.; Janousek, B. 2011. What can we learn from tobacco and other solanaceae about horizontal DNA transfer? *American Journal of Botany* 98(8): 1231–1242.
101. Tepfer D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*, 37: 959-67.
102. Tempé, J.; Goldmann, A. 1982. Occurrence and biosynthesis of opines. En: Molecular biology of plant tumours. Ed. G. Khal and J. S. Schell. *Academic Press Inc.* London LTD. Capítulo 15: 428-449.
103. Tenea, G.; Spantzel, J.; Lee, Y.; Zhu, Y.; Lin, K.; Johnson, S.; Gelvin, S. 2009. Overexpression of Several Arabidopsis Histone Genes Increases *Agrobacterium*-Mediated Transformation and Transgene Expression in Plants. *The Plant Cell* 21:3350-3367.
104. Terakura, S.; Ueno Y.; Tagami, H.; Kitakura, S.; Machida, C.; Wabiko, H.; Aiba, H.; Otten, L.; Sukagoshi, H.; Nakamura, K.; et al. 2007. An oncoprotein from the plant pathogen *Agrobacterium* has histone chaperone-like activity. *Plant Cell* 19: 2855–2865.
105. Tzfira, T.; Citovsky, V. 2003. The *Agrobacterium*-Plant Cell Interaction. Taking Biology Lessons from a Bug. *Plant Physiology* 133:943–947.

106. Tzfira, T.; Citovsky V. 2008. *Agrobacterium* from Biology to Biotechnology. Ed. Springer. Pp. 9-12.
107. Tinland, B.; Rohgitsch, O.; Michler P.; Otten L. 1990 *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA gene 6b stimulates rol-induced root formation, permits growth at high auxin concentrations and increases root size. *Mol Gen Genet* 223: 1–10.
108. Thomashow, L. S.; Reeves, S.; Thomashow, M. F. 1984. Crown gall oncogenesis: evidence that a TDNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indoleacetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81:5071-5075.
109. Ulker, B.; Li Y.; Rosso, M.; Logemann, E.; Somssich, I.; Weisshaar B. 2008. T-DNA-mediated transfer of *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal DNA into plants. *Nature Biotechnology*. 26(9): 1015 - 1017.
110. Unger, L.; Ziegler, S. F; Huffman, G. A.; Knauf, V. C.; Peet, R.; Moore, L. W.; Gordon, M. P.; Nester, E. W. 1985. New class of limited-host-range *Agrobacterium* mega-tumor-inducing plasmids lacking homology to the transferred DNA of a wide-host-range, tumor-inducing plasmid. *J Bacteriol*. 164: 723-730.
111. Valderrama, F.; Arango, I.; y Afanador, K. 2005. Transformación De Plantas Mediada Por *Agrobacterium*: “Ingeniería Genética Natural Aplicada”. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. 58(1):2569-2585.
112. Van der Graaff E.; Boot K.; Granbom R.; Sandberg G.; Hooykaas J.P. 2003. Increased Endogenous Auxin Production in *Arabidopsis thaliana* Causes Both Earlier Described and Novel Auxin-Related Phenotypes. *Journal of Plant Growth Regulation* 22(3): 240-252.
113. Van Larebeke, N.; Engler, G.; Holsters, M.; Van den Elsacker, S.; Zaenen, I.; Schilperoort, R. A.; Schell, J. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252: 169-170.
114. Veena, V.; Taylor, C. 2007. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 43 (5): 383-403.
115. Veluthambi, K.; Krishnan, M.; Gould, J.H; Smith, R.H.; Gelvin, S.B. 1989. Opines stimulates induction of the Vir genes of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *J Bacteriol* 171: 3696–3703.

116. Wabiko, H.; Minemura, M. 1996. Exogenous phytohormone-independent growth and regeneration of tobacco plants transgenic for the 6b gene of *Agrobacterium tumefaciens* AKE10. *Plant Physiol.* 112: 939-951.
117. Wagner, V. T.; Matthysse, A. G. 1992. Involvement of a vitronectrin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension culture cells. *J Bacteriol.* 174: 5999-6003.
118. Wang, K.; Herrera-Estrella, L.; Van Montagu, M.; Zambryski, P. 1984. Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell* 38: 455-462.
119. Willmitzer, L.; Dhaese, P.; Schreier, P. H.; Schmalenbach, W.; Van Montagu, M.; Schell, J. 1983. Size, location and polarity of T-DNA-encoded transcripts in nopaline crown gall tumors; common transcripts in octopine and nopaline tumors. *Cell* 32: 1045-1056.
120. White, F.; Garfinkel, D.; Huffman, G.; Gordon, M.; Nester, E. 1983. Sequence homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants. *Nature* 301:348–350.
121. White, F.; Taylor B.; Huffman, G.; Gordon, M.; Nester, E. 1985. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol.* October; 164(1): 33–44.
122. Winans, S.C. 1992. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-Plant Interactions. *Microbiol Rev* 56: 12-31.
123. Wood, D.W.; Setubal J.C.; Kaul R.; Monks D.E.; Kitajima J.P.; Okura V.K.; Zhou Y.; Chen L.; Wood, G.E.; Almeida N.F. *et al.* 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294: 2317–2323
124. Woolfe, J.A. 1992. Sweetpotato: an untapped food resource. Cambridge University press, Cambridge, UK. 118-187.
125. Yanofsky, M. F.; Porter, S. G.; Young, C.; Albright, L. M.; Gordon, M. P.; Nester, E. W. 1986. The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. *Cell* 47: 471-477.
126. Yen, D.E. 1982. Sweet potato in historical perspective. In: Villareal, R.L. and T.D. Griggs (eds.). Sweet potato, Proceedings of First International Symposium. AVRDC Publ. No. 82-172, Tainan, Taiwan. Pp. 17–30.

127. Zaenen, I.; Van Larebeke, N.; Van Montagu, M.; Schell, J. 1974. Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. *J Mol Biol.* 86: 109-127.
128. Zambryski, P.; Depicker, A.; Kruger, K.; Goodman, H. M. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. *J Mol Appl Genet.* 1: 361-370.
129. Zambryski, P.; Joos, H.; Genetello, C.; Leemans, J.; Van Montagu, M.; Schell, J. 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2:2143-2150.
130. Zhang D.P.; Carbajulca D.; Ojeda L.; Rossel G.; Milla S.; Herrera C.; and Ghislain M. 2001. Microsatellite Analysis of Genetic Diversity in Sweetpotato Varieties from Latin America. CIP Program Report 1999 – 2000. Pp. 295-301.
131. Zhang, D. P.; Ghislain, M.; Huamán, Z.; Cervantes, J. C.; Carey E. 1998. AFLP assessment of sweet potato genetic diversity in four tropical American regions. CIP Program Report 1997-1998, Pp. 303–310.
132. Zhou, X.R.; Christie, P.J. 1999. Mutagenesis of the *Agrobacterium* VirE2 Single-Stranded DNA-Binding Protein Identifies Regions Required for Self-Association and Interaction with VirE1 and a Permissive Site for Hybrid Protein Construction. *J Bacteriol.* July; 181(14): 4342–4352.
133. Zhu, J.; Oger, P. M.; Schrammeijer, B.; Hooykaas, P. J.; Farrand, S. K.; Winans, S. C. 2000. The bases of crown gall tumorigenesis. *J Bacteriol* 182:3885-3895.
134. Zupan, J.; Muth, T.R.; Draper, O.; Zambryski, P. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* 23: 11-28.

ANEXOS

Anexo N°1 Lista de muestras de DNA de 87 cultivares de *Ipomoea batatas* (L.) Lam (6x).

Código "Tesis"	Número de Accesoión CIP	Nombre de Accesoión	País de origen	Género	Nombre de especie
1	CIP 440205	Unknown	China	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
2	CIP 440145	CMR 1112	Camerún	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
3	CIP 440146	CMR 1592	Camerún	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
4	CIP 400578	Aparecido Manchado	Cuba	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
5	CIP 400632	Santiagouero	Cuba	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
6	CIP 400822	Canabacoa	República Dominicana	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
7	CIP 400830	Hoja de Pancho	República Dominicana	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
8	CIP 401111	Camote Morado	Guatemala	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
9	CIP 401104	Camote Naranja	Guatemala	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
11	CIP 440222	Sumatra	Indonesia	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
12	CIP 440283	BIS 50	Indonesia	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
13	CIP 400040	Manchester Hawk	Jamaica	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
14	CIP 441169	So 272	Islas Salomón	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
15	CIP 401212	Regional de Tehuantepec	México	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
16	CIP 401215	Colección Tierra Blanca	México	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
18	CIP 440398	500 (PI 308201)	Nueva Zelanda	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
19	CIP 401243	Amarilla	Panamá	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>

20	CIP 401248	Amarillo	Panamá	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
21	CIP 440160	Philippine	Filipinas	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
22	CIP 440163	Mugande	Ruanda	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
23	CIP 440202	Ngiriare (ACC 275)	Islas Salomón	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
24	CIP 440360	Iqui (ACC 78)	Islas Salomón	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
25	CIP 440197	Man Sai Daeng	Tailandia	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
26	CIP 440343	Unknown	Tailandia	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
27	CIP 440241	Yi Lang Red	Taiwán	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
28	CIP 440165	Kawogo	Uganda	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
29	CIP 440166	Tanzania	Uganda	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
30	CIP 401403	Morado	Venezuela	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
31	CIP 401396	unknown	Venezuela	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
32	CIP 440267	Hung Loc 4	San Vicente y las Granadinas	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
33	CIP 441724	Cuitzeo	México	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
34	CIP 441726	Tacarigua	Venezuela	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
35	CIP 441729	Blanco Ecuatoriano	Ecuador	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
36	CIP 401055	Camote Blanco	Guatemala	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
37	CIP 440274	Kaloti	Tonga	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
38	CIP 440277	Siale	Tonga	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
39	CIP 440294	Totokoitu	Islas Cook	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
40	CIP 440390	TIS 87/0087	Nigeria	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
41	CIP 400176	Oglliri	Bolivia	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
42	CIP 400458	Blanca de Sal	Colombia	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
43	CIP 400171	Amarillo	Bolivia	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
44	CIP 400176	Oglliri	Bolivia	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
45	CIP 400450	Bogotana	Venezuela	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
46	CIP 400458	Blanca de Sal	Colombia	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>

47	CIP 400578	Manchado	Cuba	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
48	CIP 400584	Bonito	Cuba	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
49	CIP 401152	Rojo	Honduras	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
50	CIP 401154	Unknown	Honduras	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
51	CIP 401169	Herbie	Jamaica	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
52	CIP 401223	Cubano	Nicaragua	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
53	CIP 401224	Camote	Nicaragua	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
54	CIP 401225	Camote	Nicaragua	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
55	CIP 401226	C-15	Nicaragua	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
56	CIP 401227	CEMSA-74-228	Nicaragua	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
57	CIP 401228	Batata Morada	Nicaragua	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
58	CIP 401253	Camote	Panamá	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
59	CIP 460397	-	Nicaragua	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
60	CIP 400002	Morado	Ecuador	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
61	CIP 400010	226	México	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
62	CIP 400020	No 2743	Venezuela	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
63	CIP 400023	Col. 633	Guatemala	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
64	CIP 400025	LOVERs NAME	San Vicente y las Granadinas	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
65	CIP 400028	Violáceo	Republica Dominicana	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
66	CIP 400030	Brasileira	Paraguay	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
67	CIP 400032	Yety Aba	Paraguay	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
68	CIP 400034	Unknown	República Dominicana	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
69	CIP 400040	Manchester Hawk	Jamaica	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
70	CIP 420509	Camote amarillo	Perú	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
71	CIP 420617	Chilpo Blanco	Perú	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>

72	CIP 440012	W - 217	Estados Unidos	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
73	CIP 440011	W - 216	Estados Unidos	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
74	CIP 440024	Yanshu 1	China	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
75	CIP 440034	Mohc	Burundi	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
76	CIP 440052	Margarita	Puerto Rico	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
77	CIP 440116	Gokoku-imo	Japón	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
78	CIP 440129	Ma'alua	Papua Nueva Guinea	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
79	CIP 440143	CMR 048	Camerún	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
80	CIP 440144	CMR 502	Camerún	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
81	CIP 440214	BIS 99	Indonesia	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
82	CIP 440222	Sumatra	Indonesia	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
83	CIP 440241	Yi Lang Red	Taiwán	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
84	CIP 440295	Seranggoon	Malasia	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
85	CIP 440305	Tawa-1	Papua Nueva Guinea	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
86	CIP 440348	Kao	Tailandia	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
87	CIP 420065	Huachano	Perú	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>

**Anexo N° 2 Lista de muestras de DNA de 5 entradas de *Ipomoea batatas* (L.)
Lam (4x).**

Código "Tesis"	Número de Accesión CIP	Número de colecta	País de origen	Género	Nombre de especie
1	CIP 403248	DLP 1818	Colombia	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
2	CIP 403261	DLP 1843	Colombia	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
3	CIP 403270	DLP 1874	Colombia	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
4	CIP 403552	DLP 5283	Ecuador	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>
5	CIP 403969	DLP 2949	México	Ipomoea L.	<i>I. batatas</i>

Anexo N° 3 Número de acceso GenBank de cepas de *A. tumefaciens*, *A. vitis*, *A. rizhogenes* y *Pseudomonas syringae*.

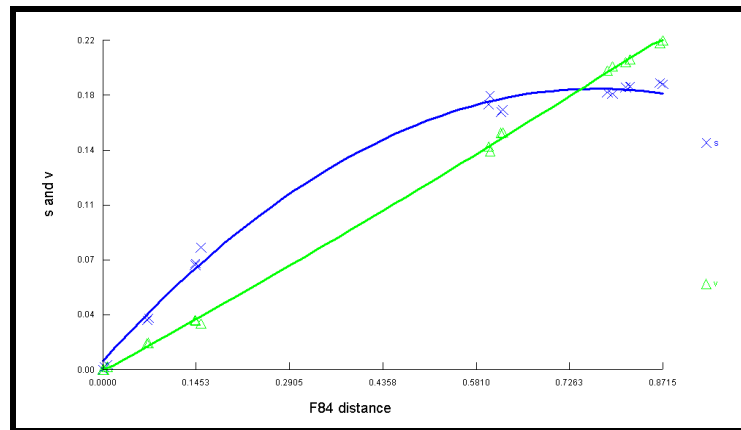
Número de accesión Genbank	Descripción
AB016260.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> plásmido pTi-SAKURA DNA, secuencia completa cepa: MAFF 301001.
AE007871.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 plásmido Ti, secuencia completa.
AJ237588.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ti plásmido pTiC58 región T-DNA.
AF126447.1	<i>Agrobacterium vitis</i> plásmido pTiTm4, secuencia completa.
DQ782955.1	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> cepa ATCC 15834, plásmido pRi 15834, secuencias parciales <i>iaaH</i> e <i>iaaM</i> .
M61151.1	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> , secuencias parciales <i>iaaH</i> e <i>iaaM</i> .
Z29717	<i>A.tumefaciens</i> (C58) <i>acs</i> gene for agrocinopine synthase.
U83986.1	<i>Agrobacterium vitis</i> plasmid pTiCG474 agrocinopine synthase, (5), and (<i>iaaH</i>) genes, (<i>iaaM</i>) pseudogene, (<i>ipt</i>) and (6b) genes, and (<i>ocs</i>) pseudogene, complete cds.
M91189.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> agrocinopine synthase gene, complete cds.
U83987.1	<i>Agrobacterium vitis</i> plasmid pTiTm4 agrocinopine synthase and (5) genes, (<i>iaaH</i>) pseudogene, and (<i>iaaM</i>), (<i>ipt</i>), (6b) and (<i>ocs</i>) genes, complete cds
AJ237588.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ti plasmid pTiC58 T-DNA region.
AE007871.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 plasmid Ti, complete sequence

AF126445.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> plasmid pTiC58 agrocinopine synthase (a), B protein (b), C protein (c), C' protein (c'), and D protein (d) genes, complete cds.
AB025110.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> gene for indole acetamide hydrolase and tryptophan monooxygenase, complete cds.
X56185.1	<i>A. tumefaciens</i> Tm4 Ti plasmid DNA with TA-iaaH interrupted by IS866, TA-iaaM, T-ipt and T-6 genes.
AM745117.1	<i>Agrobacterium vitis</i> plasmid pTiAT1 iaaH gene for indole-3-acetamide hydrolase, strain AT1.
AM745118.1	<i>Agrobacterium vitis</i> plasmid pTiAB4 iaaH gene for indole-3-acetamide hydrolase, strain AB4.
AF242881.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> octopine-type Ti plasmid, complete sequence.
DQ058764.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ti plasmid pTiBo542, complete sequence.
AF039169.1	<i>Agrobacterium vitis</i> plasmid pTiAG162 indole-3-acetamide hydrolase (iaaH) gene, complete cds.
DQ782955.1	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> strain ATCC 15834 plasmid pRi 15834 3-indoleacetamide hydrolase (aux2) and tryptophan 2-monooxygenase (aux1) genes, complete cds.
AF126446.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> plasmid pTiC58 agrocinopine synthase (acs) gene, partial cds; and 5 protein (5), indole-3-acetamide hydrolase (iaaH), and tryptophan monooxygenase (iaaM) genes, complete cds.
K02554.1	Ti plasmid (<i>A. tumefaciens</i> octopine strain) tms1 gene, complete cds.
X00493.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ti plasmid pTi15955 T-DNA region.
FN669137.1	<i>Agrobacterium vitis</i> plasmid pTiAT1 iaaM gene for tryptophan 2-monooxygenase, strain AT1.

AF061780.1	<i>Agrobacterium vitis</i> plasmid pTiAG162 tryptophan 2-monooxygenase (iaaM) gene, complete cds.
M11035.1	<i>P. syringae</i> tryptophan 2-monooxygenase (iaaM) and indoleacetamide hydrolase (iaaH) genes, complete cds

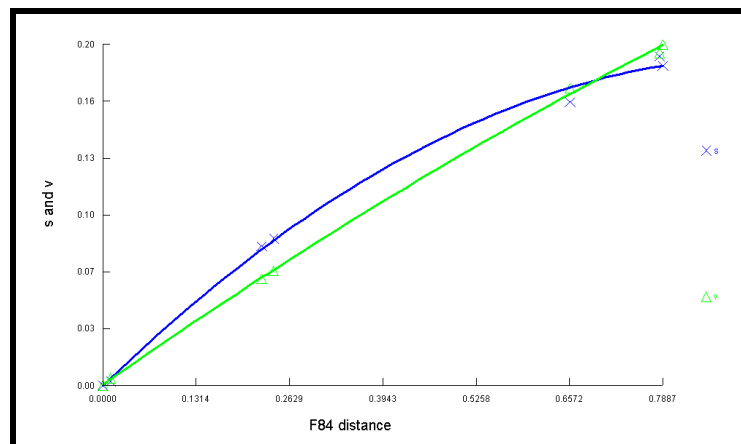
Anexo N°4 Distribución de transiciones y transversiones de las secuencias nucleotídicas de los genes *Acs*, *C*, *iaaH* e *iaaM*.

- Distribución de transiciones y transversiones de las secuencias nucleotídicas del gen *Acs* con respecto a la distancia genética con el modelo de saturación nucleotídica F84. Nótese que las transiciones presentan cierto nivel de saturación mas no las transversiones.



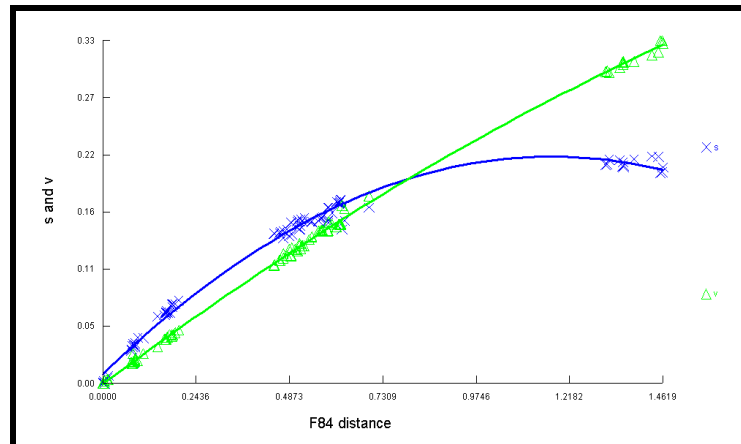
V: Transversiones; S: Transiciones.

- Distribución de transiciones y transversiones de las secuencias nucleotídicas del gen *C* con respecto a la distancia genética con el modelo de saturación nucleotídica F84. Nótese que las transiciones y transversiones no presentan ningún nivel de saturación.



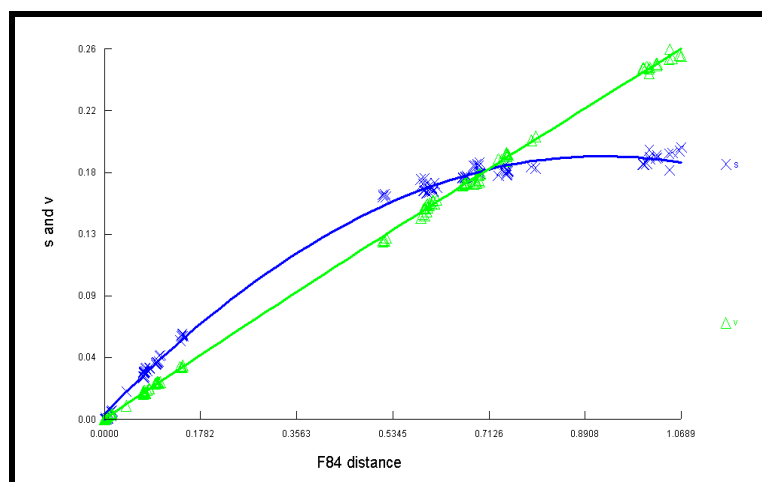
V: Transversiones; S: Transiciones.

- Distribución de transiciones y transversiones de las secuencias nucleotídicas del gen *iaaH* con respecto a la distancia genética con el modelo de saturación nucleotídica F84. Nótese que las transiciones presentan cierto nivel de saturación mas no las transversiones.



V: Transversiones; S: Transiciones.

- Distribución de transiciones y transversiones de las secuencias nucleotídicas del gen *iaaM* con respecto a la distancia genética con el modelo de saturación nucleotídica F84. Nótese que las transiciones presentan cierto nivel de saturación mas no las transversiones.



V: Transversiones; S: Transiciones.

Anexo N°5 Reactivos para extracción de DNA

➤ Buffer de extracción CTAB 2X

Compuesto	Cantidad para 1 litro
CTAB (bromuro de cetil-trimetil-amonio)	20g
NaCl	81.8 g
EDTA 0.5M pH 8.0	40ml
Tris-HCl 1M pH 8.0	100ml
PVP (polivinil pirrolidona)	10g
H ₂ O (d) c.s.p	1000ml

Nota: El CTAB y el PVP se agregan cuando la solución está caliente y luego de haber agregado todos los demás componentes.

➤ Solución de lavado I

Compuesto	Concentración final	Cantidad para 500ml
Etanol absoluto	76 %	380ml
Acetato de sodio 1M	0.2M	40ml
H ₂ O (d)		80ml

➤ Solución de lavado II

Compuesto	Concentración final	Cantidad para 500ml
Etanol absoluto	76 %	380ml
Acetato de sodio 1M	10mM	5ml
H ₂ O (d)		115ml

Anexo N°6 Formulaciones

➤ TBE 10X

Compuesto	Cantidad para 1 litro
Trizma Base	108g
Acet Acido bórico	55g
EDTA 0.5M pH 8.0	40g
H2O (d)	1000 ml

Nota: TBE 1X, se realiza una dilución de 1ml. de TBE 10X con 9 ml de agua destilada.

➤ SALB 10X

Compuesto	Cantidad para 50 ml
Azul de Bromo fenol	75 mg
Xilen cianol	75 mg
Naranja G	100 mg
Sucrosa	30 gr
TBE 10X	2.5 ml
H2O (d)	50ml

➤ Geles De Agarosa 1%

Volumen del gel	40 ml	100 ml	250 ml
TBE 1X			
Bromuro de Etidio	40 ml	100 ml	250 ml
(10mg/ml)	0.4 ml	1.0 ml	2.5 ml
Agarosa	0.4 gr	1.0 g	2.5 g

Nota: Se corre en *buffer* TBE1X en volumen apropiado.

Anexo N° 7 Soluciones utilizadas para la Transferencia *Southern blot*



➤ Ácido clorhídrico 0.25M

Compuesto	Concentración final	Cantidad para 1 litro
HCl	0.25 M	20.8ml
H ₂ O (d) c.s.p		1000ml

➤ Solución Denaturante

Compuesto	Concentración final	Cantidad para 1 litro
Na OH	0.50 M	20.00 g
NaCl	1.50 M	87.00 g

➤ Buffer de Neutralización (Ajustar a pH 8.0)

Compuesto	Concentración final	Cantidad para 1 litro
Tris	1.00 M	121.14 g
NaCl	1.50 M	87.00 g

➤ SSC 20X (Ajustar a pH 7.0 con NaOH concentrado)

Compuesto	Concentración final	Cantidad para 1 litro
Citrato de sodio tribásico dihidratado	0.30 M	88.23 g
NaCl	3.00 M	174.00 g

Anexo N°8 Soluciones DIG Easy Hyb (ROCHE)

Lavados de Astringencia

➤ Lavado I

Compuesto	Concentración final	Cantidad para 200ml
SDS 10%	0.1%	2ml
20x SSC	2x	20ml

➤ Lavado II

Compuesto	Concentración final	Cantidad para 200 ml
SDS 10%	0.1%	2ml
20x SSC	0.1%	1ml

Soluciones de Detección

➤ *Buffer* de lavado (Ajustar a pH 7.5 con NaOH concentrado).

Compuesto	Concentración final	Cantidad para 1 litro
Ácido Maleico (C ₄ H ₅ O ₅ Na)	0.1 M	15.61 g
NaCl	0.15 M	8.8 g
Tween 20	0.3%	3 ml

➤ **Solución de Bloqueo 10X**

Compuesto	Concentración final	Cantidad para 100 ml
Blocking reagent (Roche)	10%	10 g

Nota: Solución de Bloqueo 1X (100ml), se realiza una dilución de 10ml de Solución de Bloqueo 10X con 90ml de buffer Ácido Maleico.

➤ **Buffer Ácido Maleico (Ajustar a pH 7.5 con NaOH concentrado).**

Compuesto	Concentración final	Cantidad para 1 litro
Ácido Maleico (C ₄ H ₅ O ₅ Na)	0.1 M	15.61 g
NaCl	0.15 M	8.8 g

➤ **Buffer de Detección (Ajustar a pH 9.5 con HCl concentrado).**

Compuesto	Concentración final	Cantidad para 1 litro
Tris – HCl	0.1 M	12.1 g
NaCl	0.1 M	5.84 g